

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**“Optimización del uso de agar con cetiltrimetilamonio
bromuro y azul de metileno para la selección de cepas
de pseudomonas spp. productoras de ramnolípidos”**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de
Biólogo Genetista Biotecnólogo**

AUTOR

Takeshi Ricardo Tabuchi Yagui

Lima – Perú

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**“OPTIMIZACIÓN DEL USO DE AGAR CON
CETILTRIMETILAMONIO BROMURO Y AZUL DE METILENO
PARA LA SELECCIÓN DE CEPAS DE *Pseudomonas* spp.
PRODUCTORAS DE RAMNOLÍPIDOS”**

**Tesis para optar al título profesional de
Biólogo Genetista Biotecnólogo**

Bach. TAKESHI RICARDO TABUCHI YAGUI

Asesora: Mg. Susana Mónica Gutiérrez Moreno

Lima – Perú

2014

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Esta sección de mi tesis es sin duda una de las más difíciles que he tenido que redactar: son tantas las personas a las que tengo que agradecer, que estoy seguro que me faltarían páginas para poder nombrar a todos y posiblemente mi memoria no sea lo suficientemente buena para recordarlos a todos, es por ello que deberé disculparme: a pesar que sus nombres no aparezcan acá, si alguna vez me ayudaron, tengan por seguro que siempre les estaré eternamente agradecido.

En este trabajo de tesis quisiera primeramente agradecer a mis padres, Edgardo y Matilde, por su amor incondicional y constante apoyo; les tengo tanto que agradecer que aunque les dedique todos mis logros siento que no podría compensar todo lo que me han dado y han hecho por mí.

A mis hermanos, por todo lo que he aprendido y sigo aprendiendo de ustedes, porque sé que pase lo que pase siempre podré contar con ustedes.

A mi querida universidad y *alma mater*, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y mi estimada Facultad de Ciencias Biológicas; por todo lo que he podido aprender dentro de sus aulas (y fuera de ellas) y por todos los momentos que viví durante mi paso como estudiante que quedarán guardados en mi corazón.

A mis queridos profesores Susana Gutiérrez y Fernando Merino, por ser mis mentores y guías en esta aventura llamada investigación. Por haberme recibido y tratado como un hijo más. Por haberme aceptado para ayudar en su laboratorio cuando aún era un novato (casi cachimbo) y haberme entrenado en las “artes” de la microbiología. Por todos sus consejos y enseñanzas. Porque sin su apoyo, este trabajo de tesis no sería una realidad.

A la profesora Betty Shiga, por esa conversación que tuvimos en un momento de crisis durante mi segundo año en la universidad, que evitó que me retirara de la carrera y de la universidad. Sus sabias palabras y consejos trajeron luz en un momento de oscuridad y orientaron mi camino hacia lo que soy ahora.

A mis compañeros y amigos Manuel Hospinal y Diandra Martínez. Por todos esos momentos de trabajo y de ocio que hemos vivido juntos en el laboratorio. Porque parte de los resultados de esta tesis se lo debo a ustedes. Juntos pudimos cargar con un proyecto tan grande como el FINCyT y pudimos salir adelante, sé que sin ustedes hubiera sido imposible hacerlo.

A Daniel Giraldo, porque mi trabajo de tesis nació a partir del suyo. A pesar de no haber tenido el gusto de conocerlo mucho ni de interactuar suficiente, me proporcionó abiertamente toda la información y conocimientos que necesitaba para poder iniciar mi trabajo con los ramnolípidos.

A la Cheche (Yessenia Manrique), la Chuchu (Cinthya Ballardo), el Chocho (Paul Terán) y el Chichi (Isaías Castillo), porque los considero como mis hermanos mayores. Por todos sus consejos y enseñanzas que me ayudaron a aprender más rápido la microbiología. Por haberme entrenado cuando recién ingresé al laboratorio y no sabía nada.

A todos los demás chicos y chicas del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana S-23 que pasaron por él durante mi estancia o que aún se encuentran allí, a quienes considero mis compañeros y amigos: Kim Valladares, Gustavo Calleja, Guillermo Romero, Jaime Guzman, Pamela Pacheco, Carmen Bocangel, Karla Vásquez, Eliza Gonzales, Carla Meza, Erika Castañeda, y en especial a Elim Paredes, por haber hecho de mi estadía en el laboratorio una experiencia más divertida y placentera, y por haber aguantado todas mis bromas pesadas, sin olvidar su constante

esfuerzo y toda su invaluable ayuda cuando había que trabajar de verdad. Porque el laboratorio no podría funcionar sin el valioso esfuerzo de todas personas que trabajan en el.

A Katty Zumaeta (de Titalandia), porque su ayuda y consejos, aunque no están directamente relacionados a mi tesis, sí tienen mucho que ver con mi desarrollo como científico, investigador, genetista y microbiólogo. (Y porque sé que nunca me perdonará si no la menciono en mis agradecimientos).

A mis profesores de pregrado, de quienes pude aprender gran parte de lo que se ahora, quienes llenaron mi mente de ciencia y quienes de una u otra manera moldearon el científico que soy ahora.

A mis compañeros y amigos de la base GyB 08, con quienes viví experiencias inolvidables y de quienes aprendí muchísimas cosas; y aunque ahora cada uno ya haya tomado rumbos distintos y algunos estén lejos físicamente, siempre habrá oportunidad para reencontrarnos, conversar y reírnos como en tiempos aquellos.

A todos mis compañeros del taller de Taller de Liderazgo Transformacional del APJ, con quienes aprendí importantes lecciones de vida. Porque con esta tesis ya puedo decirles con orgullo que por fin he logrado cumplir una de las metas más difíciles que me propuse hace un año atrás.

Y finalmente, al FINCyT, porque este trabajo de tesis fue parcialmente financiado con los recursos del proyecto FINCyT contrato N°238-FINCYT-IA-2013 “Producción a escala piloto de un biosurfactante ramnolipídico a partir de una cepa nativa y/o mutagenizada de *Pseudomonas* spp. aislada de ambientes contaminados con petróleo para su uso en biorremediación”.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	IV
TABLA DE CONTENIDOS	VII
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS.....	IX
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL	3
2.1. Contaminación por hidrocarburos en el Perú	3
2.2. Biotecnología y biorremediación	4
2.3. Biosurfactantes	6
2.3.1. Ramnolípidos	8
2.4. <i>Screening</i> de cepas productoras y cuantificación de biosurfactantes	11
2.4.1. Agar CTAB/MB	14
2.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2.5.1. Cepas superproductoras de ramnolípidos.....	17
2.5.2. Cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25.....	19
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
3.1. Hipótesis y variables	20
3.2. Objetivos.....	21
3.2.1. Objetivo general.....	21
3.2.2. Objetivos específicos	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1. Extracción y obtención del biosurfactante ramnolipídico patrón	22
4.2. Evaluación sobre placas de agar CTAB/MB	22
4.2.1. Nuevo método de revelado de las placas.....	23
4.2.2. Evaluación del efecto del azul de metileno en el agar	23
4.2.3. Influencia del diámetro de los pocillos y el volumen de inóculo	24
4.2.4. Evaluación del tiempo de incubación y del efecto del frío.....	24
4.2.5. Evaluación del efecto de la concentración de CTAB en el agar.....	24
4.2.6. Análisis estadístico de los datos.....	24
4.2.7. Selección de cepas de <i>Pseudomonas</i> productoras de RL.....	25
V. RESULTADOS	27

5.1.	Nuevo método de revelado de las placas.....	27
5.2.	Relación entre concentración de RL y área de los halos	30
5.3.	Evaluación del efecto del azul de metileno en el agar	31
5.4.	Influencia del diámetro de los pocillos y el volumen de inóculo	32
5.5.	Evaluación del tiempo de incubación y del efecto del frío.....	36
5.6.	Evaluación del efecto de la concentración de CTAB en el agar.....	42
5.7.	Selección de cepas de <i>Pseudomonas</i> productoras de RL.....	44
VI.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	47
6.1.	Nuevo método de revelado de las placas.....	47
6.2.	Relación entre concentración de RL y área de los halos	49
6.3.	Evaluación del efecto del azul de metileno en el agar	51
6.4.	Influencia del diámetro de los pocillos y el volumen de inóculo	52
6.5.	Evaluación del tiempo de incubación y del efecto del frío.....	53
6.6.	Evaluación del efecto de la concentración de CTAB en el agar.....	55
6.7.	Parámetros ideales de trabajo con el método del agar CTAB/MB	57
6.8.	Selección de cepas de <i>Pseudomonas</i> productoras de RL.....	58
VII.	CONCLUSIONES	59
VIII.	RECOMENDACIONES.....	60
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
X.	ANEXOS	72

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

Ecuación 1. Fórmula de corrección para reducir la variabilidad generada por las placas. A_{c_x} (Área corregida), A_{o_x} (Área del halo original), A_p (área del patrón de la placa correspondiente).	26
Ecuación 2. Ejemplo de un sistema de ecuaciones que concuerda con la curva del área de los halos H5. $f(x)$: Área de los halos (cm^2); x : Concentración de RL (g/L).....	51
Figura 1. Estructura del Ramnolípido tipo 1, 2, 3 y 4 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
Figura 2. Halos de acomplejamiento (izquierda) y halos de precipitación (derecha).	27
Figura 3. Time-lapse de la formación de los halos de precipitación luego de añadir HCl 1N.	27
Figura 4. Halos de acomplejamiento con luz cenital (A) y a contra luz (B); halos de precipitación (C). Nótese la equivalencia de los halos formados.	28
Figura 5. Esquematización de los diversos halos formados bajo diferentes condiciones. Halos de acomplejamiento (izquierda: 35°C y $35^\circ\text{C}+4^\circ\text{C}$) y halos de precipitación (derecha: $35^\circ\text{C}+\text{HCl}$ y $35^\circ\text{C}+4^\circ\text{C}+\text{HCl}$). En gris aquellos halos que sólo son observables bajo ciertas condiciones.	28
Figura 6. Gráfico del área de los halos de precipitación en placas de agar CTAB/MB. Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto.	30
Figura 7. Gráfico del área de los halos de precipitación en placas de agar CTAB/MB. Detalle de las concentraciones de RL menores a 100 g/L . Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto.	31
Figura 8. Halos de acomplejamiento. (A) Agar CTAB sin MB, (B) Agar CTAB/MB con 24 horas de incubación a 35°C . (C) Agar CTAB/MB con 24 horas de incubación a 35°C , seguido por 24 horas de refrigeración (post-incubación a 4°C).	32
Figura 9. Halos de precipitación en placas de agar CTAB sin MB. De izquierda a derecha: 200, 150, 100, 50 y 25 g/L de RL.....	32
Figura 10. Comparación de la área de los halos formados en los diferentes diámetros de pocillo con diferentes concentraciones de RL. Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto.	33
Figura 11. Gráfico de la media de las áreas de los halos H5 a diferentes concentraciones de RL respecto al volumen inoculado. Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto.	34
Figura 12. Gráfico de las medias del área de los halos formados por los inóculos con el mismo contenido de RL. Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto.	35
Figura 13. Gráfico del área de los halos H5 en placas de agar CTAB/MB incubadas a diferentes tiempos. Placas con 24 horas de post-incubación a 4°C (refrigeración) se indican con “+R”. Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto. .	36
Figura 14. Gráfico del área de los halos H5 en placas de agar CTAB/MB incubadas a diferentes tiempos. Detalle de las concentraciones de RL menores a 50 g/L . Placas con 24 horas de post-incubación a 4°C (refrigeración) se indican con “+R”. Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto.	37

Figura 15. Comparación del área de los halos H5 de diferentes concentraciones de RL a diferentes tiempos de incubación. Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto.	39
Figura 16. Gráfico comparativo entre el área de los halos de las placas con 24 horas en frío (12h+R y 24h+R) y las no refrigeradas (24h). Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto.	41
Figura 17. Halo de acomplejamiento sin refrigeración (izquierda) y luego de 24 horas de incubación a 4°C (derecha). Nótese el incremento en el tamaño del halo y la intensificación del color azul.	41
Figura 18. Halos de precipitación obtenidos antes de la refrigeración (izquierda) y luego de la refrigeración (derecha). Nótese la mejor separación de los halos y la formación de nuevos márgenes.	42
Figura 19. Gráfico del área de los halos H5 en placas de agar CTAB/MB con diferentes concentraciones de CTAB. Líneas indican los puntos de quiebre (BP) aproximados. Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto.	43
Figura 20. Gráfico del área de los halos H5 en placas de agar CTAB/MB con diferentes concentraciones de CTAB. Detalle de las concentraciones de RL menores a 100 g/L. Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto.	43
Figura 21. Proporción de cepas reactivadas que pertenecen al género <i>Pseudomonas</i> y que son productoras de RL.	44
Figura 22. Distribución de las cepas pertenecientes al género <i>Pseudomonas</i> en relación al área de sus halos tras la primera etapa de selección.	45
Figura 23. Área de los halos formados por las 12 cepas con mayor producción de RL en placas de agar CTAB/MB tras la segunda etapa de selección. Comparación con una solución de 25 g/L de RL purificado (gris) y las cepas control <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PB25 (morado) y P, <i>aeruginosa</i> ATCC 9027 (naranja). Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto.	46
Figura 24. Estructura molecular de un mono-RL y di-RL (arriba), CTAB (centro) y azul de metileno en sus diferentes estados de oxidación (abajo). Recuadro rojo para regiones hidrofóbicas, recuadro azul para regiones hidrofílicas y círculos verdes para residuos capaces de formar interacciones iónicas.	49
Figura 25. Gráfico del área de los halos de precipitación en placas de agar CTAB/MB. Ubicación aproximada de los puntos de quiebre (BP) y fórmulas de regresión de cada segmento. Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto.	50
 Tabla 1. Descripción de los diversos halos formados bajo diferentes condiciones.	29
Tabla 2. Valores de significación bilateral de la prueba de T-Student para igualdad de medias entre el área de los halos de los pocillos de 3.5 mm y 5.5 mm de diámetro con 10 µl de diferentes concentraciones de RL.	34
Tabla 3. Valores del parámetro R2 del cálculo de regresión lineal del área del halo H5 de inóculos con diferente concentración de RL, obtenidos mediante método analítico (SPSS) o mediante método gráfico.	35
Tabla 4. Valores de significación bilateral de la prueba de T-Student para igualdad de medias entre el área de los halos de los inóculos con el mismo contenido de RL. ...	36
Tabla 5. Valores del parámetro R2 del cálculo de regresión lineal del área del halo H5 de las 4 menores concentraciones de RL (3.125; 6.25; 12.5 y 25 g/L) de los	

tratamientos 48h+R y 96h+R, obtenidos mediante método analítico (SPSS) o mediante método gráfico.	37
Tabla 6. Valores de significación de la prueba ANOVA para comparar los resultados de los tiempos de incubación.	38
Tabla 7. Resultados de la prueba post-hoc HSD de Tukey para comparación a pares (I-J) de los tiempos de incubación.	38
Tabla 8. Cálculo del ratio molar RL:CTAB en los halos formados con las diferentes concentraciones de RL.....	39
Tabla 9. Valores de significación de la prueba ANOVA para comparar el efecto de la incubación 4°C por 24h (+R). Comparación de los tratamientos 24h, 12h+R y 24h+R.	40
Tabla 10. Resultados de la prueba post-hoc HSD de Tukey para comparación a pares (I-J) de los tratamientos 24h, 12h+R y 24h+R.	40
Tabla 11. Resultados de la prueba post-hoc HSD de Tukey para comparación a pares (I-J) de las 12 mejores cepas productoras de RL obtenidas del primer screening en relación a las 3 mejores productoras de la última prueba realizada.....	46
Tabla 13. Valores de significación de la prueba de Levene para igualdad de varianzas entre el área de los halos de los pocillos de 3.5 mm y 5.5 mm de diámetro con 10 µl de diferentes concentraciones de RL.	72
Tabla 14. Valores de significación de la prueba de Shapiro-Wilk para distribución normal del área de los halos de los pocillos de 3.5 mm y 5.5 mm de diámetro.	72
Tabla 15. Valores de significación de la prueba de Levene para igualdad de varianzas entre el área de los halos de los inóculos con el mismo contenido de RL.	73
Tabla 16. Valores de significación de la prueba de Shapiro-Wilk para distribución normal del área de los halos a diferentes tiempos de incubación.....	73
Tabla 17. Valores de significación de la prueba de Shapiro-Wilk para distribución normal del área de los halos en placas con diferente concentración de CTAB.	73
Tabla 18. Valores de significación de la prueba de Shapiro-Wilk para distribución normal del área de los halos de las cepas productoras de RL probadas en el agar CTAB/MB.	74

RESUMEN

El uso de biosurfactantes en biorremediación facilita y acelera la degradación microbiana de hidrocarburos. El método del agar CTAB/MB creado por Siegmund y Wagner para el *screening* de cepas productoras de ramnolípidos (RL), ha sido ampliamente utilizado sin sufrir mejoras significativas en más de 20 años.

Con el fin de optimizar la técnica como método cuantitativo, se hicieron placas con agar CTAB/MB y se probaron diferentes variables, tales como tiempo de incubación, refrigeración, concentración de CTAB, presencia de azul de metileno, diámetro de los pozos y volumen del inóculo. Adicionalmente, se desarrolló un nuevo método para detectar el RL de los halos mediante precipitación con HCl, lo cual permite la observación de un nuevo patrón de halos más fáciles de observar y medir.

Este trabajo reafirma que este método no es del todo apropiado para un análisis cuantitativo fino, debido a la dificultad de correlacionar de forma precisa la concentración de RL y el área de los halos formados. La difusión del RL no parece tener un comportamiento simple y existen numerosos factores que afectan la velocidad de migración del RL. A pesar de todo, aún es muy útil para una pre-selección semi-cuantitativa de cepas productoras de RL; si bien no es posible determinar exactamente cuánto RL se ha producido, aún es posible diferenciar cepas con productividad significativamente diferentes bajo condiciones similares. La aplicación de este método y su modificación permitió reducir el número candidatos de 2517 cepas potenciales a tan solo 3 cepas superproductoras (0.12%).

Palabras clave: Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB), azul de metileno, *Pseudomonas*, *screening*, ramnolípidos, biosurfactantes

ABSTRACT

Use of biosurfactants in bioremediation, facilitates and accelerates microbial degradation of hydrocarbons. CTAB/MB agar method created by Siegmund & Wagner for screening of rhamnolipids (RL) producing strains, has been widely used but has not improved significantly for more than 20 years.

With the purpose of optimize the technique as a quantitative method, CTAB/MB agar plates were made and different variables were tested, like incubation time, cooling, CTAB concentration, methylene blue presence, wells diameter and inoculums volume. Furthermore, a new method for RL detection within halos was developed: precipitation of RL with HCl, allows the formation a new halos pattern, easier to observe and to measure.

This work reaffirm that this method is not totally suitable for a fine quantitative analysis, because of the difficulty to accurately correlate RL concentration and the area of the halos. RL diffusion doesn't seem to have a simple behavior and there are a lot of factors that affect RL migration rate. Regardless, it's still very useful for semi-quantitative pre-selection of RL-producing strains; although it's not possible to determine exactly how much RL has been produced, it's still achievable to distinguish strains with significantly different productivity under same conditions. The use of this method and its modification allowed decreasing the number of candidates from 2517 potential strains to just 3 overproducing strains (0.12%):

Keyword: Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB), methylene blue, *Pseudomonas*, screening, rhamnolipids, biosurfactants

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación con hidrocarburos representa un serio riesgo para el medioambiente y una amenaza real a la salud pública. Ante este problema surge la biorremediación como alternativa de solución. La degradación biológica, no obstante, es usualmente más lenta que el tratamiento químico y físico; una forma de acelerar este proceso es el uso de biosurfactantes biodegradables; ya que intensifican la emulsificación de hidrocarburos, lo que permite su solubilidad e incrementa su biodisponibilidad para la degradación microbiana.

Desde hace décadas se han ido desarrollando numerosas técnicas para identificar cepas productoras de biosurfactantes. En particular, Siegmund y Wagner (1991) desarrollaron una técnica de *screening* para cepas productoras de ramnolípidos (RL) que resultó ser bastante eficiente y ventajosa respecto a técnicas anteriores. Ellos utilizaron agar mineral con cetiltrimetilamonio bromuro (CTAB) y azul de metileno (MB) para detectar la producción de RL gracias a la formación de unos halos de color azul. Esta técnica, sin embargo, presenta una seria limitante: hay evidencia que la técnica no es apropiada para realizar análisis cuantitativos precisos, requisito necesario para una buena técnica de *screening*; no obstante, el método ha sido ampliamente utilizado sin sufrir mejoras significativas por más de 20 años.

Es por tal motivo que en el presente trabajo se considera que la técnica de *screening* desarrollada por Siegmund y Wagner aún posee un gran potencial por explotar y presenta numerosos aspectos susceptibles de ser mejorados y optimizados. Si se lograra establecer las condiciones en las que sea posible correlacionar

matemáticamente el área de los halos formados con la concentración de ramnolípidos, la técnica podría ajustarse para ser utilizada efectivamente como método cuantitativo en la selección de cepas superproductoras de ramnolípidos. Una buena técnica cuantitativa facilita el trabajo de *screening* y permite acelerar la selección e identificación de cepas superproductoras con potencial biotecnológico.

La importancia de este trabajo radica en que la optimización de esta técnica permitiría la mejor selección de cepas superproductoras de biosurfactantes de una manera sencilla y rápida. La selección de una buena cepa productora contribuiría en incremento de la productividad de los ramnolípidos, lo que permitiría la creación y desarrollo de una industria antes inexistente debido a limitaciones económicas causadas por una baja productividad. Con una mayor producción, los ramnolípidos finalmente podrían ser ampliamente usados en numerosas industrias y particularmente en la biorremediación de suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos u otros compuestos hidrofóbicos.

II. MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL

2.1. Contaminación por hidrocarburos en el Perú

La economía del Perú se ha basado tradicionalmente en la explotación, procesamiento y exportación de recursos naturales. Sólo el sector Minería e Hidrocarburos representó más del 94% del valor de las exportaciones de productos tradicionales y casi el 70% del valor total de las exportaciones en el II trimestre del 2013, siendo uno de los sectores más importantes para la balanza comercial del Perú (BCRP, 2013). No obstante su importancia económica, estas actividades generan los peores casos de contaminación de suelos y aguas, lo que constituye una amenaza real a la salud pública y el medio ambiente.

En el Perú se vienen registrando derrames de petróleo desde 1978, y todos los años se reportan más casos de contaminación de suelos y aguas, incluidas las zonas cercanas a los pozos petroleros, refinerías, puntos de comercialización y vías de transporte, debido a un manejo inadecuado del petróleo y sus derivados. Sólo por mencionar los más recientes e importantes: Torata (Enero 26, 2008), Tumbes (Enero 30, 2008), Plazapampa (Setiembre 11, 2008), Río Amazonas-Barrio Florido (Enero 10, 2009), Talara (Febrero 28, 2009), Pucallpa (Marzo 3, 2009), Río Itaya-Maynas (Setiembre, 2009), Río Corrientes (2009), Cabo Blanco y Peña Negra (Febrero 07, 2010), San Andres-Paracas (Marzo 1, 2010), La Tortuga-Talara (Abril 6, 2010), Río Pabellón (Mayo, 2010), Río Marañon-Tiwinza (Junio 19, 2010), Río Marañon-Saramurillo (Diciembre, 2011), Lobitos-Piura (Julio 4, 2013) Río Utcubamba-Bagua (Septiembre 21, 2013) (Mundo Azul, 2012; El Comercio, 2013); sin olvidar mencionar el accidente del Deepwater Horizon (Abril 20-22, 2010) que provocó un derrame de

petróleo incontrolado en el golfo de México que causó enormes daños de complicada y lenta reparación.

En el suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos que dependiendo de diversos factores pueden ser procesos más o menos lentos lo que ocasiona una mayor toxicidad. En el agua, la mancha generada por los hidrocarburos vertidos flota por diferencia de densidades impidiendo la entrada de luz y el intercambio gaseoso, dando comienzo a la solubilización de compuestos hidrosolubles, afectando a diversos organismos. Dicha contaminación ocasiona el deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente, así como la desaparición de gran cantidad de especies vegetales y animales.

En el Perú existe la Ley General del Ambiente (Ley N° 28611), la Ley del Sistema Nacional de Evaluación de Impacto Ambiental (Ley N° 27446) y el Reglamento para la Protección Ambiental en las Actividades de Hidrocarburos (D.S. N° 046-93-EM y D.S. N° 015-2006-EM) que exige a las empresas realizar EIAs (estudios de impacto ambiental); y en caso de accidentes, obliga la inmediata remediación del daño ambiental generado.

2.2. Biotecnología y biorremediación

La biotecnología puede entenderse como una ciencia aplicada que aplica los conocimientos y técnicas biológicas para el desarrollo de productos o servicios; que incluye el uso de organismos vivos o parte de ellos para la producción o biotransformación de productos de interés.

El uso de los microorganismos en la industria para producir diversos compuestos es motivado principalmente por factores económicos, debido a que a menudo los

procesos biotecnológicos suelen ser menos costosos y ambientalmente más amigables que los procesos químicos (Giraldo, 2012). Últimamente el uso de la biorremediación se ve incentivado debido al creciente interés de las empresas de optar por soluciones “eco-amigables”. Muchas de las estrategias de biorremediación son competitivas en términos de costos y el impacto sobre la matriz contaminada (Volke-Sepúlveda & Velasco-Trejo, 2003). La biorremediación de suelos contaminados con materiales peligrosos es generalmente más efectiva en relación a los procesos físicos y químicos convencionales, brindando enfoques mucho más prácticos; adicionalmente, al contrario de los tratamientos fisicoquímicos que en ocasiones resultan en una contaminación colateral y requieren de tratamientos de descontaminación adicionales, la biorremediación ofrece una solución terminal para el problema. Por lo tanto, no es sorprendente que en los últimos años la biotecnología ambiental enfocada en los procesos de biorremediación haya ganado un amplio reconocimiento e importancia entre las alternativas para la limpieza de zonas contaminadas con una amplia variedad de residuos peligrosos (Evans & Furlong, 2003).

Las prácticas de biorremediación consisten, pues, en el uso de organismos vivos como plantas, algas, cianobacterias, hongos, actinomicetos y bacterias (naturales o modificadas genéticamente) para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o convirtiéndolas en inocuas para el ambiente y la salud humana (Benavides, *et al.*, 2006), eliminando por lo tanto futuros problemas y costos. La meta final de la biorremediación, es la mineralización del contaminante; es decir, la completa degradación de una molécula orgánica hasta compuestos inorgánicos (CO_2 , agua y formas inorgánicas de N, P y S) y componentes celulares. Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos

contaminados con solventes, explosivos, clorofenoles, pesticidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Volke-Sepúlveda & Velasco-Trejo, 2003)

El uso de consorcios microbianos ha sido una técnica bastante estudiada e implementada en muchos casos de contaminación de petróleo en suelos y aguas estáticas; no obstante, el tiempo que requieren dichos consorcios para lograr una biodegradación efectiva (en términos prácticos) aún resulta una limitante. Una forma de acelerar este proceso es mediante la adición de biosurfactantes (Sen, 2010); éstos intensifican la emulsificación de hidrocarburos, permitiendo su solubilización e incrementando su biodisponibilidad para la degradación microbiana. A diferencia del uso de surfactantes químicos para el tratamiento de contaminación por hidrocarburos que pueden resultar en una contaminación ambiental colateral debido a los subproductos tóxicos no biodegradables, los métodos biológicos son más seguros para el ambiente y en ocasiones más eficientes.

2.3. Biosurfactantes

Un surfactante es básicamente una molécula anfipática que posee una región hidrofóbica y una región hidrofílica, por lo tanto tiene la propiedad de disminuir la tensión superficial entre líquidos inmiscibles y el agua, reduciendo la energía requerida para la formación de emulsiones y facilitando la solubilización de dichos líquidos (Mulligan, 2005).

Es importante remarcar que la efectividad de todo surfactante está determinada por su habilidad de reducir la tensión superficial, la cual es una medida de la energía libre de la superficie por unidad de área. La tensión superficial puede correlacionarse proporcionalmente con la concentración del surfactante en el medio, hasta que la Concentración Micelar Crítica (CMC) es alcanzada. La CMC está definida como la

mínima concentración necesaria para la iniciación de la formación de micelas; la cual es influenciada por el pH, la temperatura y la fuerza iónica del medio. Los buenos surfactantes para la industria son aquellos que tienen una baja CMC y por lo tanto es necesaria una menor cantidad del surfactante para reducir la tensión superficial. Otras de las propiedades típicas y deseables para los diversos surfactantes incluyen el poder detergente, habilidad humectante y capacidad espumante (Giraldo, 2012).

Aunque tradicionalmente los surfactantes han sido producidos de forma sintética, existe una amplia variedad de microorganismos que también son capaces de producirlos de forma natural a partir de una gran variedad de sustratos tales como azúcares, aceites, hidrocarburos y residuos industriales (Mulligan, 2005); a los surfactantes de origen biológico se les denominan biosurfactantes. Los biosurfactantes microbianos son en general menos tóxicos y más biodegradables que los surfactantes sintéticos y son, incluso, mucho más efectivos, eficientes y seguros en diferentes aplicaciones biotecnológicas, industriales y ambientales (Klosowska-Chomiczewska, *et al.*, 2011).

Los biosurfactantes son un grupo bastante diverso de biomoléculas: existe una enorme variedad de moléculas producidas por una diversidad (también enorme) de organismos (Kapadia Sanket & Yagnik, 2013; Pacwa-Plociniczak, *et al.*, 2011; Bodour, *et al.*, 2003). Dependiendo de su estructura molecular pueden ser agrupados en glicolípidos, lipopéptidos, fosfolípidos, ácidos grasos, lípidos neutros y compuestos poliméricos y particulados. La mayoría de estos surfactantes suelen ser aniónicos o neutrales, sólo un pequeño grupo son catiónicos debido a la presencia de grupos amino en sus moléculas. (Mulligan & Gibbs, 2004).

La parte hidrofóbica de los biosurfactantes suele estar basada en ácidos grasos de largas cadenas, hidroxiácidos grasos o α -alquil- α -hidroxiácidos grasos. En contraparte

la porción hidrofílica de la molécula puede ser un carbohidrato, aminoácido, péptido cíclico, fosfato, ácido carboxílico o alcohol (Mulligan & Gibbs, 2004).

Algunos biosurfactantes son producidos a partir de hidrocarburos como sustratos, estando la producción asociada al crecimiento. En estos casos, los microorganismos deben emulsificar el sustrato (extracelular) para facilitar su paso a través de la membrana. Sin embargo los biosurfactantes también pueden ser producidos a partir de carbohidratos, los cuales son muy solubles, de modo que de esta forma los biosurfactantes son usualmente metabolitos secundarios producidos durante la parte final de la fase logarítmica y/o durante la fase estacionaria (Mulligan & Gibbs, 2004).

2.3.1. Ramnolípidos

Los ramnolípidos (RL) son los biosurfactantes glicolípidos más intensamente y mejor estudiados. Están compuestos por una (mono-RL) o dos (di-RL) moléculas de ramnosa (enlazadas mediante un enlace glicosídico α -1,2) unidas a un grupo aglicano (no-glicósido) mediante un enlace O-glicosídico. El grupo 2-OH distal del grupo ramnosa permanece generalmente libre, aunque en raros homólogos está acilado con largas cadenas de ácidos alcanóicos (Abdel-Mawgoud, *et al.*, 2011). El grupo aglicano está compuesto por una o dos (ocasionalmente tres) cadenas β -hidroxi ácido graso, generalmente saturados, de una longitud variable entre C_8 y C_{16} . Las cadenas de ácidos grasos están unidas entre sí por un enlace éster entre el grupo β -hidroxilo de la cadena distal con el grupo carboxilo de la cadena proximal. A la fecha se han reportado cerca de 60 congéneres y homólogos diferentes de ramnolípidos (Abdel-Mawgoud, *et al.*, 2011).

La producción de glicolípidos con ramnosa fueron descritos por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa* por Jarvis y Johnson (1949), siendo esta la principal especie

productora de ramnolípidos; no obstante, existen también otras especies que son también capaces de producir ramnolípidos, la mayoría pertenecientes al género *Pseudomonas* y *Burkholderia*, y algunas especies de otros géneros “menos comunes” (Toribio, *et al.*, 2010).

P. aeruginosa sintetiza una mezcla de mono- y di-RLs con residuos hidroacilos de entre C₈ y C₁₂, siendo los principales ramnolípidos producidos, el L-Rhamnosyl-L-rhamnosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) y L-rhamnosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate (Rha-C₁₀-C₁₀), denominados RL tipo 1 y tipo 2 respectivamente (Parra, *et al.*, 1989). También se ha reportado la formación de RLs tipo 3 (Rha-C₁₀) y tipo 4 (Rha-Rha-C₁₀) que contienen un ácido β-hidroxidecanóico con una o dos unidades de ramnosa respectivamente; derivados metil-éster de RL-1 y RL-2; y variantes de los ramnolípidos con cadenas de ácidos grasos alternativas (Desai & Banat, 1997). La cantidad, proporción y variedad de los diversos ramnolípidos de la mezcla producida por una bacteria dependerá del metabolismo y genoma de la especie y cepa en particular, de las condiciones de cultivo y de la fuente de carbono utilizada (Monteiro, *et al.*, 2007; Santos, *et al.*, 2002).

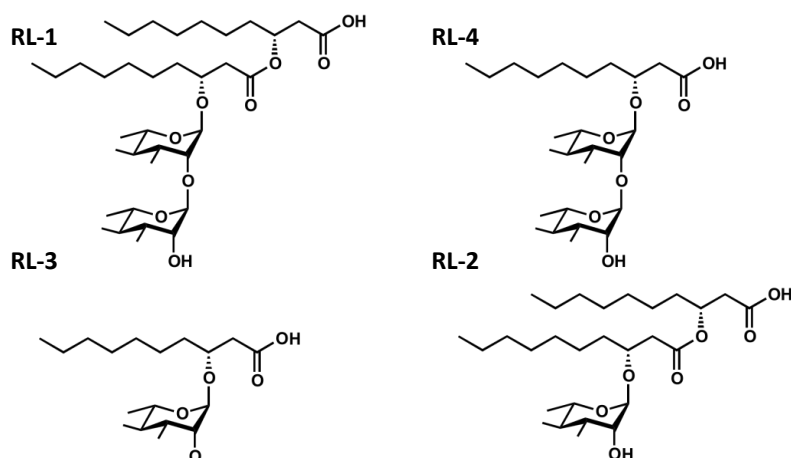


Figura 1. Estructura del Ramnolípido tipo 1, 2, 3 y 4 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Ramnolípidos de *Pseudomonas* spp. han demostrado que son capaces de emulsificar y disminuir la tensión interfacial y superficial de diversos alcanos como hexadecano (Hisatsuka, *et al.*, 1971; Herman, *et al.*, 1997) y octadecano (Zhang & Miller, 1992), así como también se ha demostrado que su producción estimula el crecimiento de *P. aeruginosa* en sustratos lipídicos como aceites e hidrocarburos (Zhang, *et al.*, 2005; Zhu, *et al.*, 2007; Zhang, *et al.*, 2012); es por ello que los ramnolípidos tienen el potencial de facilitar la biodegradación de sustancias que tienen una solubilidad limitada en el agua como el ácido palmítico y esteárico (Chayabutra, *et al.*, 2011), n-alcanos (Zhang & Miller, 1995), hidrocarburos aromaticos policíclicos (Déziel, *et al.*, 1996; Hwang & Cutright, 2002; Nie, *et al.*, 2010), clorpirifos (Singh, *et al.*, 2009), 2,4-diclorofenol (Uysal & Türkman, 2005) incluso crudo de petróleo (Yateem, *et al.*, 2002; Urum, *et al.*, 2003; Zhang, *et al.*, 2005); y por lo tanto favorecen la bioremediación de sitios contaminados (Zhang & Miller, 1992; Kosaric, 2001; Benincasa, 2007; Singh, *et al.*, 2009; Pacwa-Plociniczak, *et al.*, 2011; Christofi & Ivshina, 2002).

Entre sus propiedades fisicoquímicas podemos mencionar un pKa entre 4.28 y 5.50 dependiente de su estructura predominante y su concentración (Lebrón-Paler, *et al.*, 2006), una baja tensión superficial mínima promedio (30-32 nM/m), alta actividad emulsificante promedio (10.4-15.5 U/mL), baja concentración mínima micelar (CMC) que varía según el pH (5-65 mg/L) y gran afinidad por moléculas orgánicas hidrofóbicas (Van Dyke, *et al.*, 1993; Parra, *et al.*, 1989).

Las aplicaciones de los ramnolípidos, no obstante, no sólo se limitan a la biodegradación y biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos. Su capacidad de incrementar la solubilidad, formar espuma y disminuir la tensión superficial genera una alta demanda para un amplio rango de aplicaciones industriales

(Desai & Banat, 1997). En particular, se han utilizado en la industria cosmética en productos como humectantes, dentífricos, lubricantes y shampoo (Lang & Wullbrandt, 1999). También se ha demostrado su eficacia en la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados (Giraldo, 2012; Elouzi, *et al.*, 2012; Maqsood, *et al.*, 2011; Wen, 2010; Ara, 2007; Mulligan, 2005) y el surfactante ramnolípido en sí es una buena fuente de ramnosa que es un azúcar muy costosa por sí misma (Linhardt, *et al.*, 1989).

A pesar que ya han pasado más de 60 años desde el descubrimiento de los ramnolípidos en 1949, estos aún no han sido significativamente empleados ni producidos industrialmente debido a razones técnicas y económicas, relacionados a su baja competitividad económica frente a los surfactantes químicos sintéticos, principalmente determinada por la baja productividad de los bioprocesos empleados (Abdel-Mawgoud, *et al.*, 2011). Sin embargo, gracias a que actualmente la “compatibilidad ambiental” es un factor determinante en la producción de químicos industriales, el interés se está desviando hacia los productos biológicos. Las mayores mejoras en la bioproducción de ramnolípidos se pueden lograr si se realizan estudios que permitan alcanzar un mejor entendimiento de los procesos biológicos que regulan el metabolismo de dichas moléculas y si se encuentran o crean cepas más productivas y eficientes (Abdel-Mawgoud, *et al.*, 2011).

2.4. Screening de cepas productoras y cuantificación de biosurfactantes

Desde hace décadas se han ido desarrollando numerosas técnicas para identificar cepas productoras de biosurfactantes y cuantificar su capacidad de producción (Walter, *et al.*, 2010). La mayoría de métodos para realizar un *screening* de cepas productoras se basan en los efectos físicos de los surfactantes o capacidad para interferir en interfaces hidrofóbicas. Adicionalmente existen metodologías específicas para ciertos

grupos de biosurfactantes como el método del agar CTAB/MB. Los métodos de *screening* pueden dar resultados cualitativos y/o cuantitativos; aunque para propósito de una selección primaria de cepas, los métodos cualitativos son generalmente suficientes (Walter, *et al.*, 2010).

Estas técnicas son descritas y comparadas en numerosos trabajos (Heyd, *et al.*, 2008; Walter, *et al.*, 2010; Dusane, *et al.*, 2010; Abdel-Mawgoud, *et al.*, 2011; Youssef, *et al.*, 2004; Chen, *et al.*, 2007; Satpute, *et al.*, 2008). A continuación se enlistan varias de ellas, especialmente aquellas usadas para la detección de ramnolípidos.

Medición directa de la tensión superficial/interfacial:

- Medición de la reducción de la tensión superficial (Guerra-Santos, *et al.*, 1984; Haussler, *et al.*, 1998; Gunther IV, *et al.*, 2005).
- Método por *Du-Noüy-Ring* (Tadros, 2005).
- Método Estalagmométrico (Plaza, *et al.*, 2006).
- Técnica *Pendant-Drop-Shape* (Chen, *et al.*, 2007; Tadros, 2005).
- Técnica *Axisymmetric Drop Shape Analysis by Profile* (Van Der Vegt, *et al.*, 1991).

Medición indirecta basada en la tensión superficial/interfacial:

- Ensayo *Drop Collapse* (Jain, *et al.*, 1991).
- Ensayo en Microplacas (Vaux & Cottingham, 2001).
- Ensayo de Penetración (Maczek, *et al.*, 2007).
- Ensayo de Esparcimiento en Aceite (Morikawa, *et al.*, 2000).
- Capacidad Emulsificante (Cooper & Goldenberg, 1987).
- Solubilización de Antraceno cristalizado (Willumsen & Karlson, 1997).

Métodos indirectos basados en la hidrofobicidad de la superficie celular:

- Ensayo de adhesión bacteriana a hidrocarburos (BATH) (Rosenberg, *et al.*, 1980).
- Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC) (Smyth, *et al.*, 1978).

- Ensayo de Réplica en placa (Rosenberg, 1981).
- Ensayo de Agregación de sales (Lindahl, *et al.*, 1981).

Métodos especiales:

- Hemolisis en Agar sangre (Mulligan, *et al.*, 1984; Siegmund & Wagner, 1991).
- Método colorimétrico usando placas con CTAB y Azul de Metileno (Siegmund & Wagner, 1991).
- Método de formación de complejo con Azul de Metileno (Pinzon & Ju, 2009b; Jurado, *et al.*, 2006).

Estimación de biosurfactantes por cuantificación de fragmentos (residuos) de la molécula:

- Estimación de biosurfactantes usando reactivo de Antrona (Helbert & Brown, 1957; Pons, *et al.*, 1981).
- Estimación de biosurfactantes usando el método de Orcinol (Chandrasekaran & BeMiller, 1980; Koch, *et al.*, 1991).
- Estimación de biosurfactantes usando el método de Resorcinol (Kulka, 1956; Monsigny, *et al.*, 1988).
- Estimación de biosurfactantes usando Cisteína (Dische & Shettles, 1948).

Métodos cromatográficos y espectrométricos:

- Cromatografía de capa fina (TLC) (De Koster, *et al.*, 1994; Rendell, *et al.*, 1990).
- Cromatografía de gases (GC) (Arino, *et al.*, 1996; Van Dyke, *et al.*, 1993).
- Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) (Déziel, *et al.*, 1999; Lépine, *et al.*, 2002; Mata-Sandoval, *et al.*, 1999).
- Espectrometría de masas (MS) (Déziel, *et al.*, 1999; De Koster, *et al.*, 1994; Lépine, *et al.*, 2002; Nie, *et al.*, 2010; Gunther IV, *et al.*, 2005; Wang, *et al.*, 2007).
- Espectrometría infrarroja por transformación de Fourier (FTIR) (Borgund, *et al.*, 2007; Gartshore, *et al.*, 2000) y FTIR con reflectividad total atenuada (ATR-FTIR) (Leitermann, *et al.*, 2008).

- Espectrometría de Resonancia magnética nuclear (NMR) (Choe, *et al.*, 1992; Monteiro, *et al.*, 2007).

Una combinación de estos métodos es generalmente usada para la detección y estimación de la producción de ramnolípidos. Algunas de estas técnicas, sobre todo aquellas que estiman el contenido de ramnolípido en relación a sus residuos de ramnosa o de ácidos grasos, requieren de una pre-purificación de las muestras para evitar reacciones cruzadas. Salleh *et al.* (2011) hace una revisión de tres de las técnicas más utilizadas: extracción con solventes, precipitación con sulfato de amonio y precipitación con ácidos.

Es de suma importancia el desarrollo de métodos rápidos y confiables para el *screening* y selección de microorganismos productores de biosurfactantes de entre miles de organismos potencialmente activos y la subsecuente evaluación de su actividad y propiedades tensioactivas (Walter, *et al.*, 2010). De acuerdo a Chen *et al.* (2007) un buen método de *screening* debe satisfacer tres requerimientos:

- La habilidad de identificar organismos potenciales y discernir entre muchos otros que no lo son.
- La habilidad de evaluar cuantitativamente cuan efectivo es el surfactante.
- La habilidad de evaluar numerosos candidatos rápidamente.

Adicionalmente, una técnica ideal también debe ser sencilla de aplicar, barata y no perjudicial para la salud y el medio ambiente.

2.4.1. Agar CTAB/MB

El método de *screening* usando agar mineral con cetiltrimetilamonio bromuro (CTAB) y azul de metileno (MB) fue desarrollado por Siegmund y Wagner en 1991 inicialmente para detectar producción de ramnolípidos. La detección se basa en la formación de un patrón muy particular de halos de color azul debido a la interacción

entre el ramnolípido, el CTAB y el azul de metileno; aunque el mecanismo exacto por el cual se forma dicho patrón es aún desconocido. La técnica resultó ser bastante eficiente y ventajosa respecto a técnicas anteriores debido a su bajo costo, simplicidad, versatilidad y especificidad. Desde entonces la técnica ha sido ampliamente utilizada por diversos autores para seleccionar cepas productoras de ramnolípidos (Siegmund & Wagner, 1991; Wild, *et al.*, 1997; Yuste, *et al.*, 2000; Christova, *et al.*, 2004; Gunther IV, *et al.*, 2005; Perfumo, *et al.*, 2006; Zhu, *et al.*, 2007; Pinzon, 2009; Jadhav, *et al.*, 2011; Liu, *et al.*, 2011).

La técnica surgió como alternativa al uso de agar sangre para la detección de biosurfactantes pues presenta varias ventajas, como por ejemplo la no represión catabólica de la producción de biosurfactantes, no ocurrencia de falsos positivos debido a presencia de hemolisinas, mayor estabilidad del agar, etc. Adicionalmente es posible aplicar diferentes condiciones de cultivo directamente sobre el agar (por ejemplo: diferentes sustratos o temperaturas) y es posible evaluar colonias individuales (a diferencia de los métodos en cultivo líquido).

Una de las desventajas de la técnica es que, aunque *Pseudomonas aeruginosa* puede crecer sin dificultad, el CTAB inhibe el crecimiento de numerosas bacterias incluso del mismo género *Pseudomonas*; Siegmund y Wagner (1991) sugieren por eso que sería posible el remplazo del CTAB por otro surfactante catiónico.

Siegmund y Wagner (1991) categorizaron a su técnica como un método semi-cuantitativo al revelar una aparente proporcionalidad entre la concentración de ramnolípidos y el diámetro de los halos de acomplejamiento (halos formados por el complejo RL-CTAB-MB); Pinzon y Ju (2009a) por su parte, también llegaron a sugerir una relación lineal entre la concentración de ramnolípidos y el área de los halos; no obstante, determinaron que el ratio de acomplejamiento molar (*molar complexation*

ratio) entre el ramnolípido y el CTAB no es constante y que parecería responder una interacción de naturaleza compleja; esto sumado al hecho que dicha formación del complejo está en un estado transicional dependiente del tiempo, hizo que los autores sugieran posteriormente que la técnica no era apropiada para un análisis cuantitativo preciso, por lo que sólo lo recomiendan para el *screening* de cepas y otros propósitos cualitativos (Pinzon & Ju, 2009a).

A pesar de todos esos inconvenientes, defectos y limitaciones, dicha técnica ha permanecido prácticamente invariable por más de 20 años sin mejoras significativas, con excepción de las breves sugerencias dadas por Gunther IV *et al.* (2005) y Pinzon & Ju (2009a).

2.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (Schroeter 1872) es la especie-tipo del género *Pseudomonas* (Migula 1894). Está ampliamente distribuido en la naturaleza (suelos y aguas) y es causante de infecciones nosocomiales oportunistas en pacientes inmunocomprometidos y también en plantas.

Es una bacteria Gram-negativa de forma bacilar, quimioorganotrófica, aeróbica, con un flagelo unipolar (motilidad), no formadora de esporas, capacidad denitrificante, oxidasa positiva, catalasa positiva, lipasa positiva. *P. aeruginosa* secreta una variedad de pigmentos característicos: piocianina (verde-azul), pioverdina (verde-amarillo fluorescente), piorubina (rojo-marrón) y fluoresceína (verde fluorescente).

P. aeruginosa es capaz de crecer en diesel y gasolina, por lo que se le categoriza como un HUM (*hydrocarbon-using microorganism*). A pesar de ser clasificado como organismo aeróbico, es considerado por muchos investigadores como anaeróbico

facultativo, ya que está bien adaptado para proliferar en condiciones de escasez parcial o total de oxígeno (Garrity, 2001).

2.5.1. Cepas superproductoras de ramnolípidos.

Actualmente al margen de los estudios enfocados en la optimización de los medios de producción de ramnolípidos, también se realizan numerosas investigaciones dedicadas a la obtención de nuevas y mejores cepas productoras (Giraldo, 2012).

A pesar que las bacterias productoras de biosurfactantes pueden ser encontradas tanto en suelos contaminados como no-contaminados; la distribución, diversidad y abundancia depende enormemente de las condiciones del suelo (Bodour, *et al.*, 2003; Menezes Bento, *et al.*, 2005). Por lo general, las cepas superproductoras naturales de ramnolípidos (principalmente del género *Pseudomonas*) son encontradas y aisladas de ambientes que presentan gran cantidad de sustratos hidrofóbicos (Chrzanowski, *et al.*, 2012; Willumsen & Karlson, 1997), principalmente zonas contaminadas con crudo de petróleo o derivados (Plaza, *et al.*, 2006): suelos y aguas cercanas a pozos de extracción, refinerías, oleoductos e industrias petroquímicas (Giraldo, 2012; EL-Amine Bendaha, *et al.*, 2012; Liu, *et al.*, 2011; Zhu, *et al.*, 2007; Pérez Silva, *et al.*, 2006; Wei, *et al.*, 2005; Yateem, *et al.*, 2002; Santa Anna, *et al.*, 2001; Turkovskaya, *et al.*, 2001; Yuste, *et al.*, 2000). En el Perú las regiones petroleras más importantes se concentran en la costa y selva norte, principalmente en los departamentos de Piura y Loreto (MINEM - Perú, 2010). Dichas cepas silvestres han adaptado su metabolismo para poder desarrollarse en un ambiente relativamente hostil donde los nutrientes son generalmente escasos, el sustrato carbonado más abundante no se encuentra soluble,, el intercambio gaseoso es reducido y existe un mayor estrés oxidativo

causado por especies reactivas de oxígeno; condiciones que promueven la producción de ramnolípidos.

La colonización de hábitats atípicos por parte de estas bacterias predisponen a delecciones, rearrreglos genómicos y acumulación de mutaciones de pérdida-de-función en el cromosoma (Cornelis, 2008); es por ello que los genomas de estas cepas también suelen contener una serie de mutaciones que favorecen la producción de ramnolípidos a diferentes niveles: en la propia ruta de biosíntesis de RL (rhlA, rhlB, rhlC), en genes reguladores de dicha ruta (rhlR, rhlI, algR) en rutas metabólicas precursoras (algC, rmlA, rmlB, rmlC, rmlD, sistema FAS II), en la regulación del *quorum sensing* (lasR, lasI, qscR, vqsR, vqsM, ptxR, dksA), en los mecanismo de defensa frente al estrés, en el la formación de *biofilm*, o incluso en rutas metabólicas que compiten directa o indirectamente por precursores comunes (alginato, PHA, LPS, etc.) (Wild, *et al.*, 1997; Vinckx, *et al.*, 2010; Rehm, *et al.*, 2001; Pham, *et al.*, 2004; Olvera, *et al.*, 1999; Dusane, *et al.*, 2010; Morici, *et al.*, 2007; Tielen, *et al.*, 2010; Pearson, *et al.*, 1997; Van Delden, *et al.*, 1998).

A nivel genético también se han hecho diversos avances, sobre todo en la última década. Tahzibi *et al.* (2004) obtuvieron una cepa de *P. aeruginosa* superproductora de ramnolípidos denominada PTCC1637 mediante mutagénesis aleatoria con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina; mientras que Zhu *et al.* (2007) logró duplicar la productividad de la cepa *P. aeruginosa* zju.u1M mediante mutagénesis aleatoria por UV. Pham *et al.* (2004) generó mutantes *knock-out* isogénicos de *P. aeruginosa* para los genes de la ruta del PHA a partir de las cepas PAO1 y FRD1, observándose alteración en la producción de alginato y ramnolípidos, así como también alteración en la formación de *biofilm* y tolerancia al estrés. También se ha estudiado la posibilidad de expresar heterológamente genes de biosíntesis de ramnolípidos en otros hospederos como

Pseudomonas fluorescens y *P. putida*; en estos, dichos genes se logran expresar y pueden producir ramnolípidos; en cambio en *E. coli* se expresa la ramnosil transferasa activa pero los ramnolípidos no son producidos (Ochsner, *et al.*, 1995a). Wang *et al.* (2007) por su parte, lograron insertar mediante transposones los genes *rhlAB* en los genomas de *P. aeruginosa* PAO1-*rhlA*⁻ y *E. coli* BL21(DE3); ambas cepas lograron expresar la ramnosil transferasa y producir ramnolípidos.

2.5.2. Cepa *Pseudomonas aeruginosa* PB25

La cepa *P. aeruginosa* PB25 forma parte del banco de cepas del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM. Dicha cepa fue aislada de una zona contaminada con hidrocarburos en la provincia de Talara (Piura, Perú). Giraldo (2012), en un cultivo *batch* sin agitación y con glicerol como fuente de carbono determinó una tasa de crecimiento específica (μ) de 0.0285 h^{-1} y un tiempo generacional (t_g) de 24.321 horas; registrándose a su vez una concentración máxima de ramnolípidos de 2.47 g/L, con valores de rendimiento de 0.13 g/g y productividad de 0.082 g/L-h. De igual forma obtuvo un valor máximo de actividad emulsificante de 5.257 UAE/mL frente a crudo de petróleo e Índices de Emulsificación E24 de 53%, 64%, 62% y 84% para crudo de petróleo, diesel 2, gasolina y kerosene, respectivamente. Asimismo, logró valores máximos de remoción del 98% para plomo y 99% para cadmio en soluciones acuosas (Giraldo, *et al.*, 2014). Cabe resaltar, que anterior a dicho trabajo, no existen antecedentes de estudio de ramnolípidos en el Perú y por lo tanto constituye el punto de partida para esta rama de investigación en el país y del cual deriva a su vez la presente tesis.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis y variables

- Hipótesis de investigación (H_i)

El área de los halos puede correlacionarse matemáticamente con la concentración de ramnolípidos bajo diferentes condiciones y por lo tanto la técnica puede ajustarse para ser utilizada cuantitativamente en la selección de cepas superproductoras de ramnolípidos.

- Hipótesis nula (H_0)

El área de los halos no puede correlacionarse matemáticamente con la concentración de ramnolípidos bajo diferentes condiciones y por lo tanto la técnica no puede ajustarse para ser utilizada cuantitativamente en la selección de cepas superproductoras de ramnolípidos.

La variable dependiente es el área de los halos en el agar CTAB/MB.

Las variables independientes consisten en:

- Concentración de ramnolípidos.
- Tiempo de incubación.
- Concentración de CTAB.
- Presencia de azul de metileno.
- Diámetro de los pozos.
- Volumen del inóculo.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

- Optimizar el carácter semi-cuantitativo de la técnica del agar CTAB/MB desarrollado por Siegmund y Wagner en 1991 para la detección de ramnolípidos producidos por cepas de *Pseudomonas* spp.

3.2.2. Objetivos específicos

- Optimizar la técnica utilizando los ramnolípidos como biosurfactante modelo al evaluar la influencia de diversos parámetros (tiempo de incubación, efecto de la concentración de CTAB, efecto del MB, diámetro de los pocillos y el volumen de inóculo) en el área del halo.
- Seleccionar cepas superproductoras de ramnolípidos aisladas de ambientes contaminados con petróleo mediante la técnica del agar CTAB/MB.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Extracción y obtención del biosurfactante ramnolípido patrón

Debido a la dificultad de obtener en Perú ramnolípido purificado, se procedió a producirlo y purificarlo en el laboratorio a partir de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PB25, perteneciente al cepario del laboratorio y aislado de ambientes contaminados con petróleo, utilizando un protocolo modificado a partir del método estandarizado por Giraldo (2012). Se empleó un cultivo *batch* con agitación de 4 días de incubación a 35°C en un medio mínimo mineral suplementado con glicerol modificado de Giraldo (2012), Zhang *et al.* (2005) y Abalos *et al.* (2002): CaCl₂ 0.02 g/L, KCl 1 g/L, NaCl 1 g/L, K₂HPO₄ 4 g/L, KH₂PO₄ 4 g/L, Glicerol 3%v/v, NaNO₃ 2.5 g/L, mgSO₄·7H₂O 0.2 g/L y solución de elementos traza 2ml/L (H₃BO₃ 0.26 g/L, Na₂MoO₄ 0.6 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.5 g/L, MnSO₄ 0.5 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.7 g/L). Se procedió a una purificación mediante precipitación ácida y extracción por solventes apolares (cloroformo y éter etílico), adaptado de Giraldo (2012).

4.2. Evaluación sobre placas de agar CTAB/MB

Para evaluar las diferentes variables se hicieron placas con agar CTAB/MB según Siegmund & Wagner (1991) siguiendo las recomendaciones de Gunther IV *et al.* (2005) y Pinzon & Ju (2009a). Para todas las pruebas los parámetros utilizados fueron los que figuran en esta sección salvo que se indique lo contrario en la prueba correspondiente.

Se preparó agar mineral Siegmund & Wagner (Agar SW: Glicerol 20 g/L, KH₂PO₄ 0.7 g/L, Na₂HPO₄·2H₂O 0.9 g/L, NaNO₃ 2 g/L, mgSO₄·H₂O 0.4 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.1 g/L,

solución de elementos traza 2 mL/L y agar-agar 17 g/L) suplementado con 0.005 g/L de azul de metileno (MB) y 0.2 g/L de cetiltrimetilamonio bromuro (CTAB). El agar CTAB/MB fue esterilizado en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 psi.

Para asegurar la uniformidad de las placas, se seleccionaron placas petri con las mismas medidas (diámetro interno: ~90 mm) y se dispensó 15 ml de agar CTAB/MB en cada una, para lograr un espesor del agar de ~2 mm. En el agar se hicieron perforaciones con un sacabocados estéril de 5.5 mm de diámetro y se adicionó 20 µl de una solución de ramnolípidos (RL) en las siguientes concentraciones: 3.125; 6.25; 12.5; 25; 50; 75; 100; 150; 200 y 400 g/L. Las placas fueron incubadas a 35°C por 24 horas y luego refrigeradas a 4°C por 24 horas adicionales (Gunther IV, *et al.*, 2005).

Posteriormente, los halos de las placas fueron revelados mediante una nueva técnica y el área de los halos formados fue medido mediante el software de procesamiento de imágenes ImageJ 1.49e (Rasband, 2013). Cada experimento se realizó por triplicado y se obtuvo la media del área de los halos de cada concentración de RL.

4.2.1. Nuevo método de revelado de las placas

Se desarrolló un nuevo método para detectar el RL de los halos. El nuevo método de revelado se basa en hacer disminuir del pH del agar mediante la adición de HCl 1N y precipitar los ramnolípidos (RL) previamente acomplexados.

4.2.2. Evaluación del efecto del azul de metileno en el agar

Para evaluar si el azul de metileno es indispensable en la técnica se prepararon placas con agar SW suplementado con CTAB; y con o sin azul de metileno; y se probaron diferentes concentraciones de RL.

4.2.3. Influencia del diámetro de los pocillos y el volumen de inóculo

Para evaluar si el área de los pocillos tiene influencia en la difusión del ramnolípido y la formación de los halos, se perforaron pocillos de ~3.5 mm y ~5.5 mm de diámetro. Así mismo para determinar si tiene importancia en la formación de los halos el volumen inoculado, concentración o contenido neto de ramnolípidos, se adicionó dentro de los pocillos de 3.5 mm y 5.5 mm, volúmenes de 10 µl, 20 µl; 30 µl; 40 µl y 50 µl de soluciones de RL en concentraciones de 50 y 100 g/L.

4.2.4. Evaluación del tiempo de incubación y del efecto del frío

Para establecer si existe una dependencia del tiempo de incubación en la difusión del ramnolípido y la formación de los halos, y si existe algún límite para dicha difusión, se incubaron diferentes concentraciones de RL (3.125; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 y 200 g/L) por 12, 24, 48, 72 y 96 horas a 35°C seguido de 24 horas en refrigeración (post-incubación a 4°C). Así mismo para verificar el efecto de la temperatura se probaron placas a 24 horas de incubación pero sin refrigeración.

4.2.5. Evaluación del efecto de la concentración de CTAB en el agar

Para evaluar el efecto del CTAB en la formación de los halos, se prepararon placas con las siguientes concentraciones de CTAB: 0.05; 0.1; 0.2; 0.3 y 0.4 g/L. En cada concentración de CTAB se probó diferentes concentraciones de RL (3.125; 6.25; 12.5; 25; 50; 75; 100; 150; 200; 400 g/L).

4.2.6. Análisis estadístico de los datos

Con los datos se hicieron las gráficas respectivas y las correlaciones estadísticas necesarias utilizando las medias y las desviaciones estándar de las mediciones de las áreas de los halos. Para establecer la homogeneidad de la varianzas se aplicó el test

de Levene; mientras que para verificar la normalidad de los datos se aplicó el test de Shapiro-Wilk. Para establecer la correlación lineal entre dos variables se aplicó un análisis de regresión lineal simple. Dependiendo del caso, se aplicó la prueba ANOVA o la prueba T-Student para comparar las medias y encontrar diferencias significativas. Se realizó la prueba *post-hoc* HSD (*honestly significant difference*) de Tukey para realizar las comparaciones múltiples tras el análisis ANOVA. Se emplearon los software MS Office Excel 2007, XLSTAT 2009 y SPSS v15.0 para la realización de las pruebas estadísticas y los gráficos. Con los datos obtenidos se establecieron los parámetros ideales para poder adaptar y aplicar la técnica en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana – FCB - UNMSM.

4.2.7. Selección de cepas de *Pseudomonas* productoras de RL

Para probar el funcionamiento de la técnica en condiciones reales de laboratorio, una vez determinado y estandarizado los parámetros óptimos de la técnica; se procedió a hacer el *screening* de las cepas del banco de cepas aisladas de ambientes contaminados con hidrocarburos (Talara, Zorritos, La Pampilla, etc.) pertenecientes al laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana - UNMSM, las cuales daban una suma de 2488 cepas. Debido a que dichas cepas habían estado almacenadas por más de una década, previamente se debió reactivar las cepas en agar TSA para verificar la viabilidad y pureza. Luego las cepas fueron sembradas sobre agar Cetrimide para seleccionar las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* y aumentar la probabilidad de encontrar productoras de ramnolípidos.

Todas las cepas seleccionadas fueron cultivadas en caldo mineral SW (Siegmund & Wagner, 1991) por 48 horas a 35°C. Luego, alícuotas de 20 µl de cada sobrenadante del cultivo fue inoculado en los pocillos del agar CTAB/MB para evaluar su producción de ramnolípidos. Para la selección preliminar, las placas fueron incubadas a 35°C por

24 horas y luego refrigeradas a 4°C por 24 horas. Luego, los halos fueron revelados con HCl 1N y fotografiados para su medición digital.

Las cepas superproductoras fueron elegidas progresivamente siguiendo un método de selección anidado; luego las mejores superproductoras fueron probadas nuevamente con el método de CTAB/MB, pero esta vez las placas fueron incubadas por 48 horas a 35°C y luego refrigeradas a 4°C por 24 horas. Finalmente las bacterias fueron aisladas y almacenadas en ceparios para pruebas futuras.

Ecuación 1. Fórmula de corrección para reducir la variabilidad generada por las placas. Ac_x (Área corregida), Ao_x (Área del halo original), Ap (área del patrón de la placa correspondiente).

$$Ac_x = Ao_x \times \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Ap_i \right) / Ap_x$$

Para poder normalizar los datos y reducir el error generado por la propia placa, en uno de los pocillos de cada placa se adicionó 20 µl de una solución de RL (25 g/L) como patrón y se aplicó una fórmula de corrección (Ecuación 1). Adicionalmente, como cepas controles se utilizaron la cepa patrón *P. aeruginosa* ATCC 9027 y la cepa *P. aeruginosa* PB25 (Giraldo, 2012), esta última obtenida de una muestra de tierra de Talara y también perteneciente a la colección de cepas del laboratorio.

V. RESULTADOS

5.1. Nuevo método de revelado de las placas

El RL precipitado por el HCl, forma halos concéntricos blancos alrededor de los pocillos y en el lugar donde previamente se habían formado los halos de acomplejamiento (Figura 2).

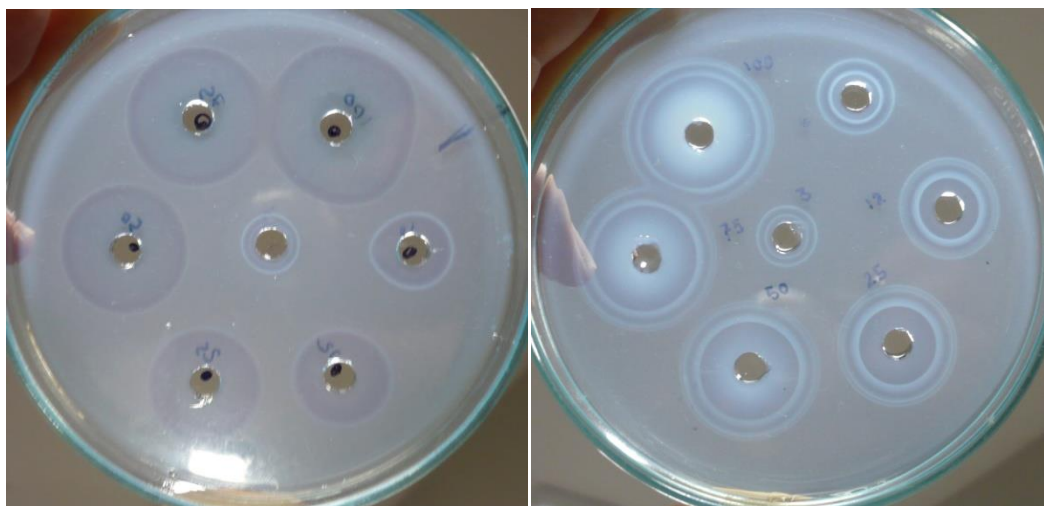


Figura 2. Halos de acomplejamiento (izquierda) y halos de precipitación (derecha).

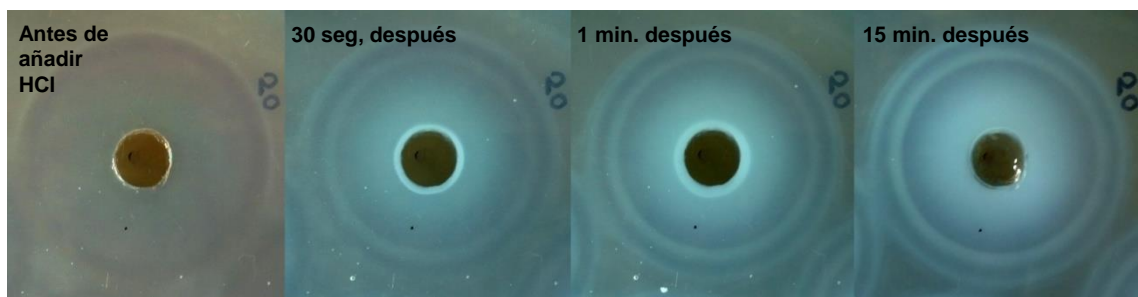


Figura 3. *Time-lapse* de la formación de los halos de precipitación luego de añadir HCl 1N.

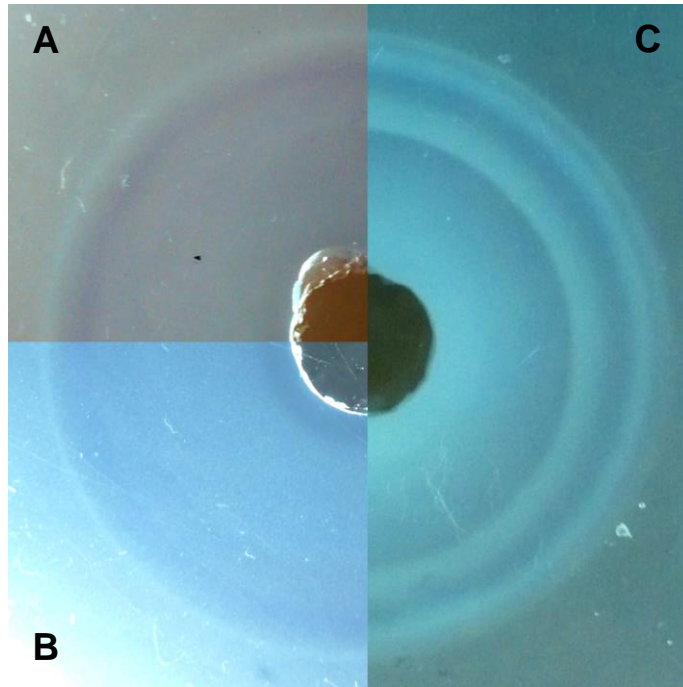


Figura 4. Halos de acomplejamiento con luz cenital (A) y a contra luz (B); halos de precipitación (C). Nótese la equivalencia de los halos formados.

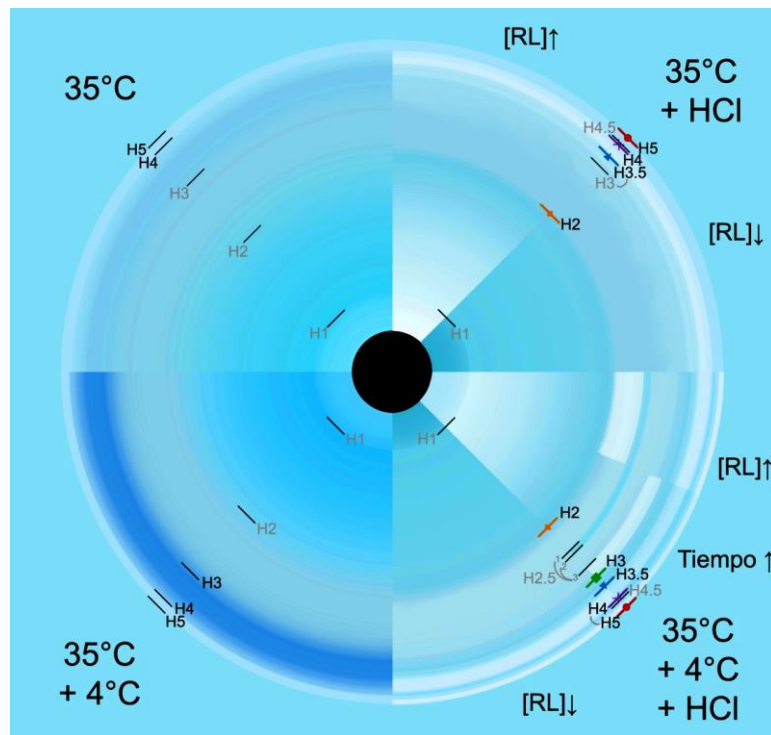


Figura 5. Esquematzación de los diversos halos formados bajo diferentes condiciones. Halos de acomplejamiento (izquierda: 35°C y 35°C+4°C) y halos de precipitación (derecha: 35°C+HCl y 35°C+4°C+HCl). En gris aquellos halos que sólo son observables bajo ciertas condiciones.

Tabla 1. Descripción de los diversos halos formados bajo diferentes condiciones.

		35°C	35°C +4°C‡	35°C +HCl	35°C +4°C +HCl	
Tiempo Incub. (h)	Temp. 35°C	24 h	24 h	24 h	24 h	
	Temp. 4°C		24 h		24 h	
	Revelado (+HCl)			15 min	15 min	
Descripción de los halos	Pocillo	0	0	0	0	Pocillo
	Halo traslúcido interno	((H1))	(H1)	((H1))	((H1))	Halo traslúcido interno
				(H1.5)	(H1.5)	Halo azul / Halo blanco ([RL]↑)
	Halo azul traslúcido	((H2))	(H2)	H2	H2	1° Frontera Translúcido-Opaco
				(H2.5 ₁)	(H2.5 ₁)	Halo opaco blanco ([RL]↑)
				((H2.5 ₂))	((H2.5 ₂))	1° Halo intermedio ([RL]↑)
				((H2.5 ₃))	((H2.5 ₃))	2° Halo intermedio (tiempo incub. >48h)
	Frontera del Halo azul traslúcido	((H3))	H3	(H3)	H3	Frontera del Halo opaco
				H3.5	H3.5	2° Frontera Translúcido-Opaco
	Halo azul oscuro / marrón	H4	H4	H4	H4	Frontera del Halo opaco
				(H4.5)	(H4.5)	Inicio del anillo exterior
	Anillo exterior blanco	H5	H5	H5	H5	Anillo exterior blanco traslúcido

‡ Descrito por Pinzon & Ju (2009a)

((H#)) Dificil de observar o medir, sólo visible bajo condiciones específicas, a veces difuso o no visible.

((H#)) Extremadamente difícil de observar o medir, sólo visible bajo condiciones específicas, usualmente difuso o no visible.

Este método permite la observación de un nuevo patrón de halos nunca antes visto o descrito (Figura 5). Con la nueva técnica se ha podido visualizar y describir hasta 11 zonas dentro de los halos (Tabla 1). Los límites de alguna de las zonas de los halos de precipitación corresponden con las zonas de los halos de acomplejamiento descritas por Pinzon y Ju (2009a); pero entre ellos se aprecia la aparición de otros halos intermedios que no se visualizan con la técnica convencional. A los límites de cada zona (H: halo) principal que se corresponde con un halo descrito por Pinzon y Ju (2009a) se le ha asignado un número entero (HX), dichos halos son en general los más

constantes, visibles y distinguibles. Entre ellos pueden aparecer halos opacos (RL precipitado) o zonas translúcidas (separación entre halos); a sus límites se les ha asignado un número racional intermedio a los halos que los flanquean (HX.5). Ocasionalmente, puede aparecer más de un halo o zona translúcida intermedia, por lo que a cada una se le ha asignado un subíndice correlativo (HX.5_y). Dependiendo de ciertas condiciones como concentración o tiempo de incubación, algunas de estas regiones son más o menos visibles, se separan más y se distinguen mejor las unas de las otras; aunque por lo general algunas no son visibles del todo o se ven superpuestas por lo que aparecen como una sola banda gruesa.

5.2. Relación entre concentración de RL y área de los halos

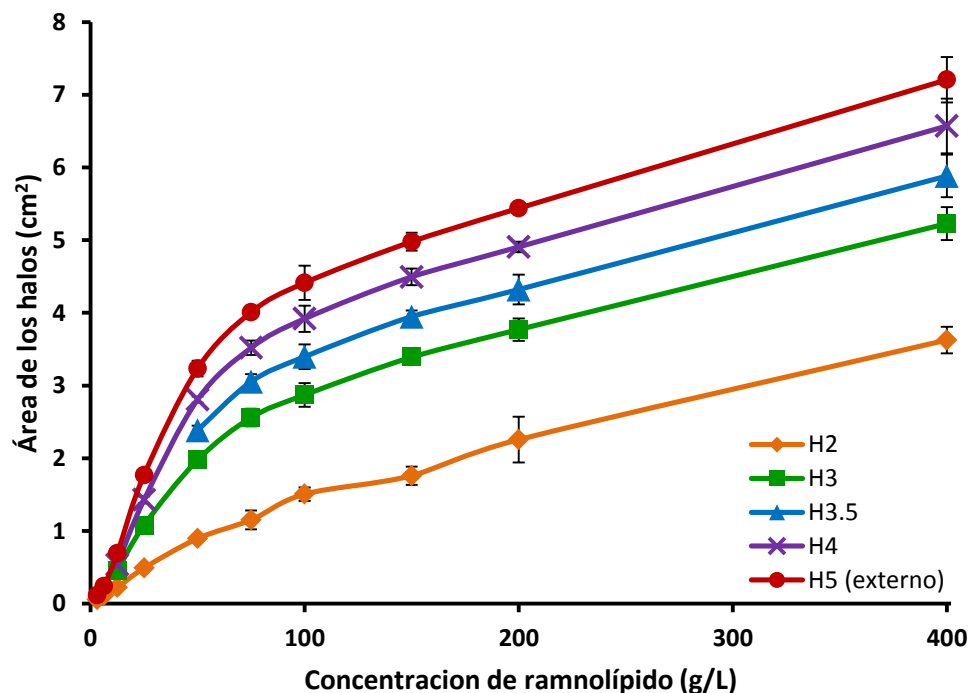


Figura 6. Gráfico del área de los halos de precipitación en placas de agar CTAB/MB. Barras verticales indican la desviación estandar de cada punto.

La medición inicial de las áreas de los halos y la gráfica de sus promedios mostró una curva claramente no-lineal con un punto de quiebre alrededor de 75 a 100 g/L de concentración de RL (Figura 6 y Figura 7). Debajo de este punto, la curva pareciera ser polinómica o logística; mientras que por encima, la curva pareciera ser lineal sin un punto de saturación aparente.

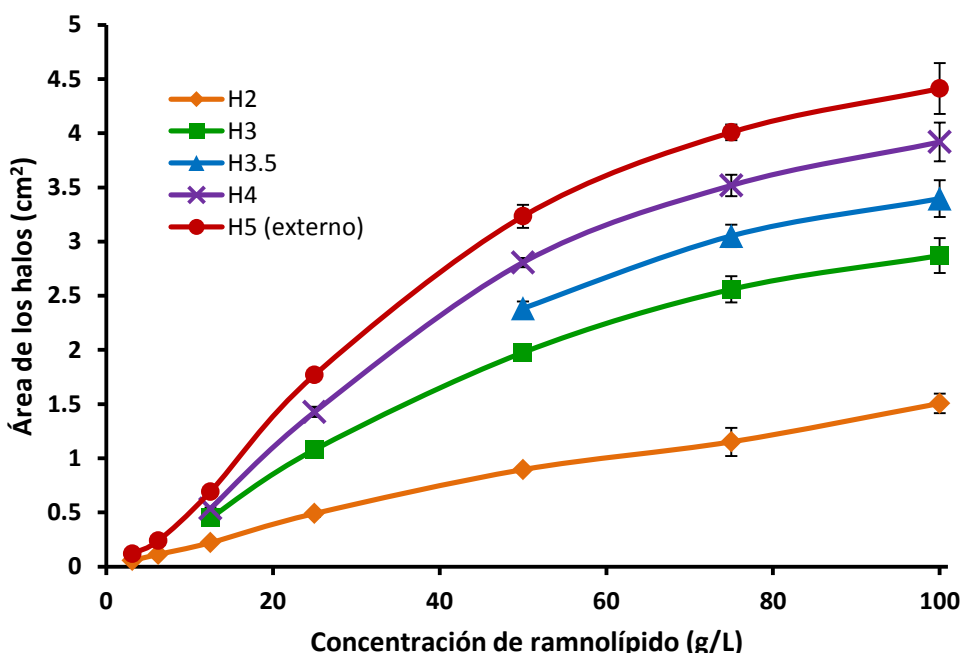


Figura 7. Gráfico del área de los halos de precipitación en placas de agar CTAB/MB. Detalle de las concentraciones de RL menores a 100 g/L. Barras verticales indican la desviación estándar de cada punto.

5.3. Evaluación del efecto del azul de metileno en el agar

En la técnica convencional el azul de metileno (MB) otorga la coloración azul característica de los halos de acomplejamiento, dicho color se intensifica cuando las placas son refrigeradas (Figura 8).

Con la nueva técnica de revelado, se ha podido observar que dependiendo de la concentración de RL, los halos de precipitación que se forman en las placas sin MB se

muestran difusos y/o poco definidos, llegando al punto que a veces ni siquiera se distinguen ni se diferencian los halos internos (Figura 9).

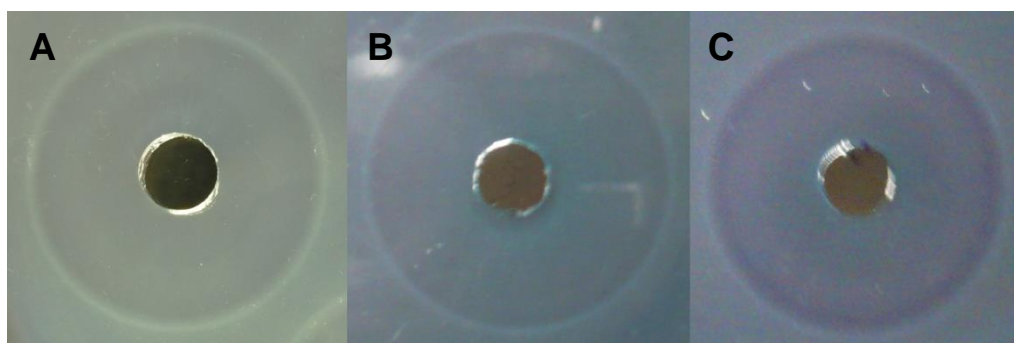


Figura 8. Halos de acomplejamiento. (A) Agar CTAB sin MB, (B) Agar CTAB/MB con 24 horas de incubación a 35°C. (C) Agar CTAB/MB con 24 horas de incubación a 35°C, seguido por 24 horas de refrigeración (post-incubación a 4°C).

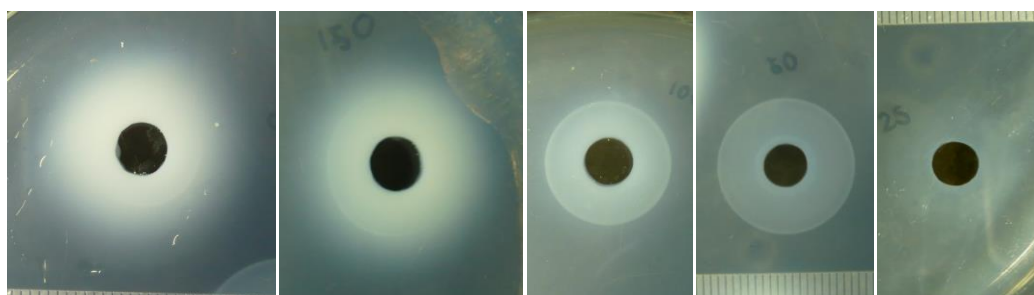


Figura 9. Halos de precipitación en placas de agar CTAB sin MB. De izquierda a derecha: 200, 150, 100, 50 y 25 g/L de RL.

5.4. Influencia del diámetro de los pocillos y el volumen de inóculo

Como primer resultado práctico, se encontró que el volumen máximo que los pocillos de 5.5 mm de diámetro podían contener sin que se corra riesgo de derrames accidentales era de 40 µl, mientras que el volumen máximo de los de 3.5 mm de diámetro era de 10 µl.

Se aplicaron dos pruebas estadísticas: la prueba de Levene para igualdad de varianzas y la prueba T-Student para diferencia de medias. En todos los casos la prueba de Levene (ANEXOS: Tabla 12) mostró que las varianzas eran iguales ($\sigma_1^2 =$

σ_2^2) ya que el valor de significación de la prueba (sig.) era mayor que el nivel de significación establecido $\alpha=0.05$.

Con relación a la media del área, los halos tienden a ser ligeramente mayor cuando el pocillo es de mayor tamaño y las concentraciones son mayores, sobre todo a 100 g/L donde la desviación se vuelve evidente; no obstante, la prueba T-Student (

Tabla 2) para igualdad de medias, asumiendo varianzas iguales según la prueba de Levene y distribución normal según la prueba de Shapiro-Wilk (ANEXOS:

Tabla 13), muestra que no existen diferencias realmente significativas en el área de los halos ($\mu_1=\mu_2$) en relación al tamaño de los pocillos para un mismo volumen de inóculo (10 μ l). En todos los casos el valor de significación bilateral de la prueba (sig.) es mayor que el nivel de significación establecido $\alpha/2=0.025$. Gráficamente (Figura 10) los puntos de ambos casos (5.5 mm y 3.5 mm) se observan superpuestos sobre todo en las concentraciones menores.

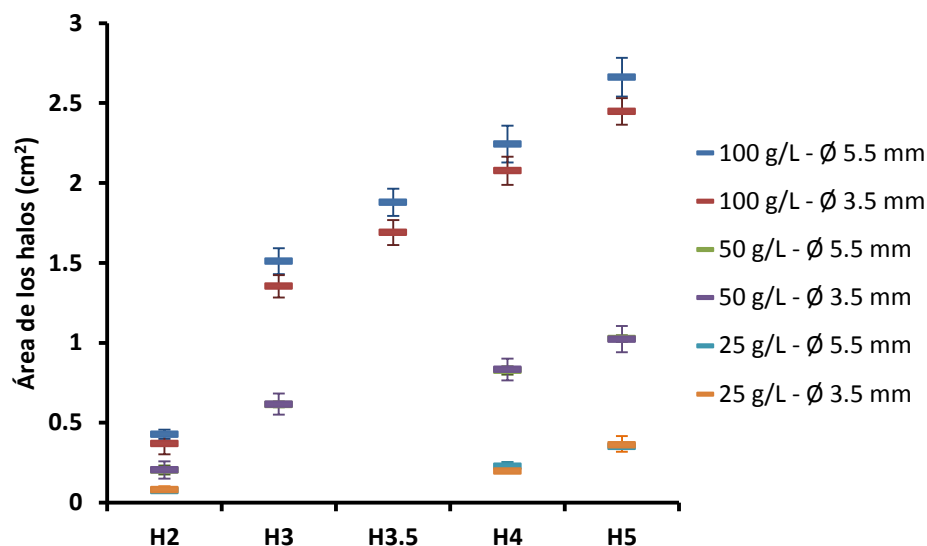


Figura 10. Comparación de las área de los halos formados en los diferentes diámetros de pocillo con diferentes concentraciones de RL. Barras verticales indican la desviación estándar de cada punto.

Tabla 2. Valores de significación bilateral de la prueba de T-Student para igualdad de medias entre el área de los halos de los pocillos de 3.5 mm y 5.5 mm de diámetro con 10 µl de diferentes concentraciones de RL.

Halo	Concentración de RL (g/L)		
	100	50	25
H2	0.248	0.993	0.707
H3	0.062	0.956	-
H3.5	0.050	-	-
H4	0.105	0.887	0.267
H5	0.065	0.939	0.888

* Diferencias significativas ($\alpha/2=0.025$)

Por su parte, la prueba de regresión lineal del área de los halos respecto al volumen del inóculo (Tabla 3), muestra un parámetro R^2 por encima de 0.96 lo que indica una aparente relación lineal. No obstante, a concentraciones mayores y volúmenes mayores, se hace evidente una pequeña distorsión en las curvas (Figura 11).

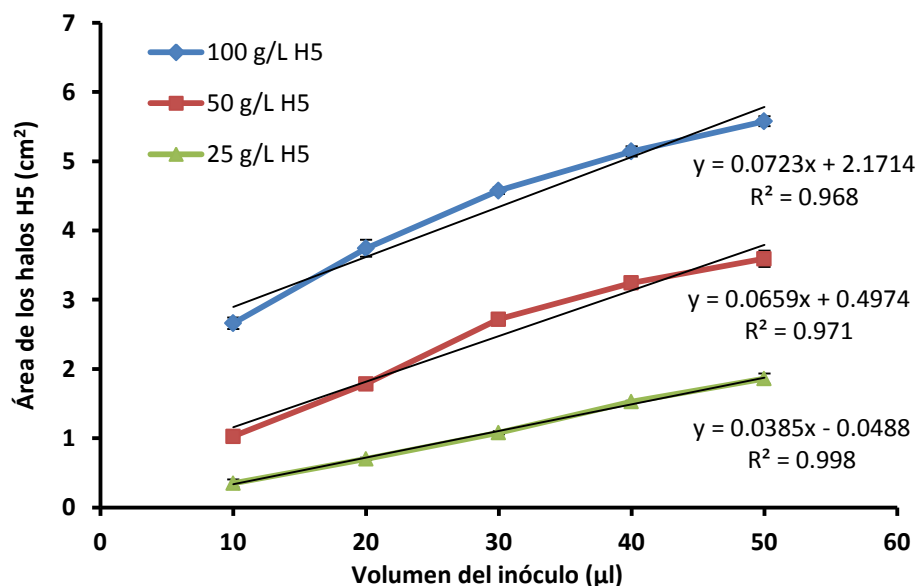


Figura 11. Gráfico de la media de las áreas de los halos H5 a diferentes concentraciones de RL respecto al volumen inoculado. Barras verticales indican la desviación estándar de cada punto.

Tabla 3. Valores del parámetro R^2 del cálculo de regresión lineal del área del halo H5 de inóculos con diferente concentración de RL, obtenidos mediante método analítico (SPSS) o mediante método gráfico.

Concentración de RL (g/L)	R^2	R^2 corregido	R^2 (a partir del gráfico de medias)
25	0.994	0.994	0.998
50	0.966	0.964	0.971
100	0.961	0.958	0.968

En relación a la equivalencia de cantidad de ramnolípido inoculado con respecto al volumen, se encontró diferencias significativas ($\text{sig.} < \alpha/2=0.025$) entre las medias de las área de los halos H3, H3.5, H4 y H5 de diferentes inóculos cuyo contenido de ramnolípido (concentración \times volumen) era supuestamente el mismo (Tabla 4). En la Figura 12 claramente se puede observar que los puntos no coinciden a pesar de tener contenidos similares de RL.

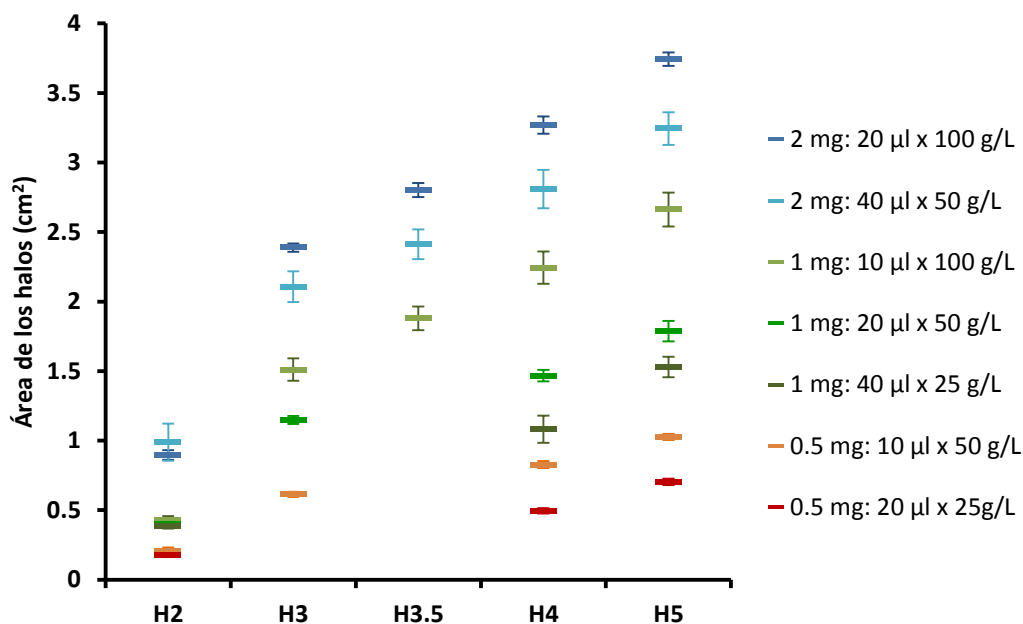


Figura 12. Gráfico de las medias del área de los halos formados por los inóculos con el mismo contenido de RL. Barras verticales indican la desviación estándar de cada punto.

Tabla 4. Valores de significación bilateral de la prueba de T-Student para igualdad de medias entre el área de los halos de los inóculos con el mismo contenido de RL.

Inóculos		20 µl x 25 g/L vs. 10 µl x 50 g/L	10 µl x 100 g/L vs. 20 µl x 50 g/L	40 µl x 25 g/L vs. 20 µl x 50 g/L	40 µl x 25 g/L vs. 10 µl x 100 g/L	20 µl x 100 g/L vs. 40 µl x 50 g/L
Contenido de RL (mg)		0.5	1	1	1	2
Halo	H2	0.188	0.182	0.344	0.111	0.310
	H3	0.000*	0.002*	-	-	0.013*
	H3.5	-	-	-	-	0.005*
	H4	0.000*	0.000*	0.003*	0.000*	0.006*
	H5	0.000*	0.000*	0.013*	0.000*	0.002*

* Diferencias significativas ($\alpha/2=0.025$)

5.5. Evaluación del tiempo de incubación y del efecto del frío

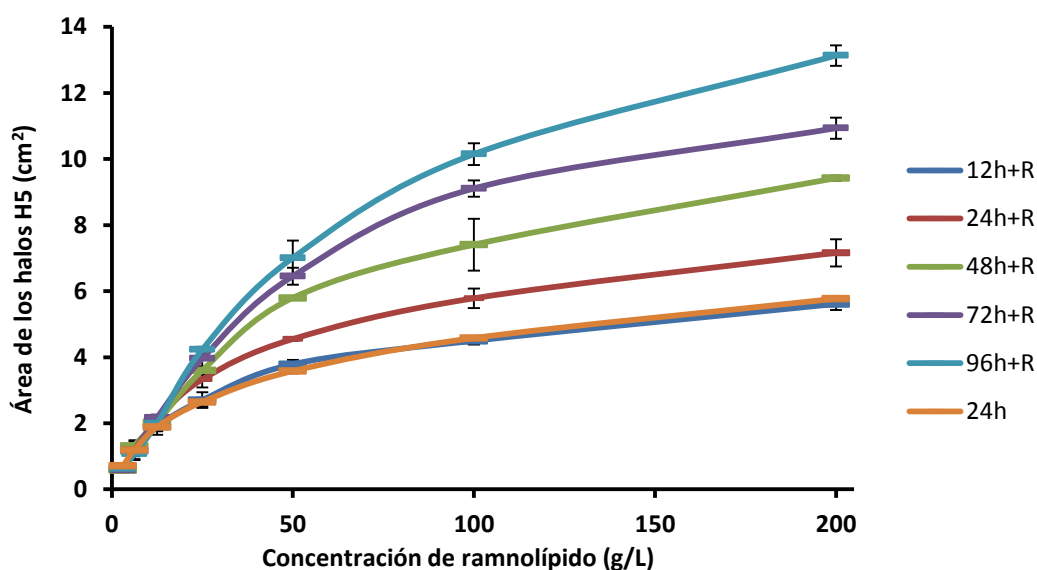


Figura 13. Gráfico del área de los halos H5 en placas de agar CTAB/MB incubadas a diferentes tiempos. Placas con 24 horas de post-incubación a 4°C (refrigeración) se indican con “+R”. Barras verticales indican la desviación estándar de cada punto.

Las gráficas (Figura 13 y Figura 14) muestran que el tamaño de los halos es dependiente del tiempo de incubación: a mayor tiempo de incubación mayor tamaño alcanzan los halos. En las gráficas se puede apreciar que el RL de las concentraciones más bajas (3.125; 6.25 y 12.5 g/L) aparentemente logra quedar inmovilizado dentro de

las 12 horas de incubación a 35°C y 24 horas a 4°C (12h+R), alcanzando una aparente relación lineal entre la concentración del RL y el área de los halos formados (Tabla 5); no obstante, las concentraciones mayores a 25 g/L no logran siquiera acercarse a dicho punto en el tiempo máximo programado en el experimento (96h+R: 96h a 35°C y 24h a 4°C).

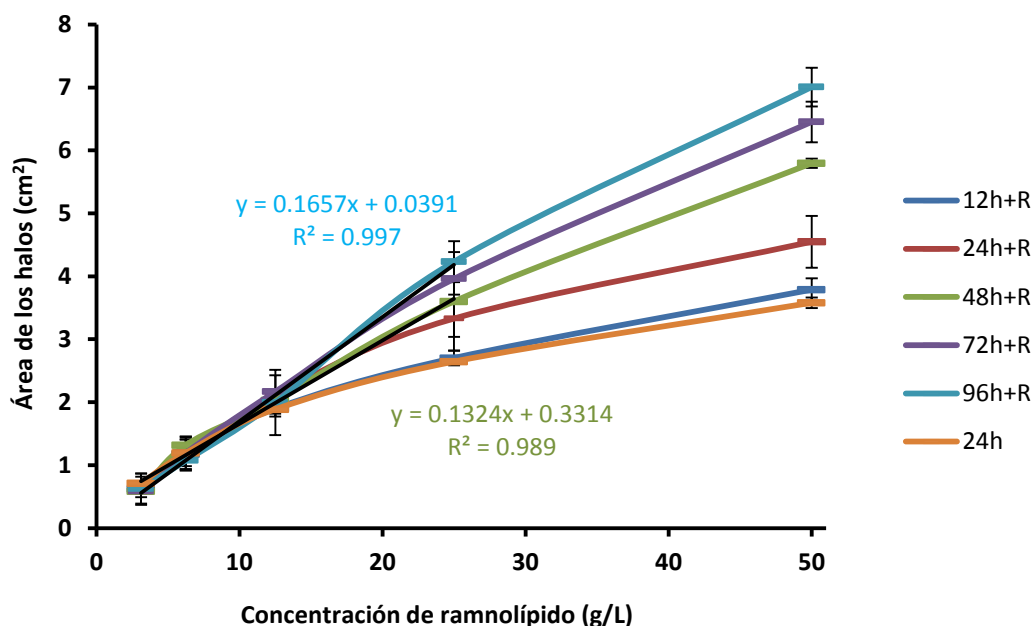


Figura 14. Gráfico del área de los halos H5 en placas de agar CTAB/MB incubadas a diferentes tiempos. Detalle de las concentraciones de RL menores a 50 g/L. Placas con 24 horas de post-incubación a 4°C (refrigeración) se indican con “+R”. Barras verticales indican la desviación estándar de cada punto.

Tabla 5. Valores del parámetro R^2 del cálculo de regresión lineal del área del halo H5 de las 4 menores concentraciones de RL (3.125; 6.25; 12.5 y 25 g/L) de los tratamientos 48h+R y 96h+R, obtenidos mediante método analítico (SPSS) o mediante método gráfico.

Tiempos de incubación	R^2	R^2 corregido	R^2 (a partir del gráfico de medias)
48h+R	0.983	0.981	0.989
96h+R	0.989	0.987	0.997

+R: 24 horas de refrigeración (post-incubación a 4°C)

La prueba ANOVA (Tabla 6) indica que no existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en las áreas de los halos (variable respuesta) de las concentraciones más

bajas (3.125; 6.25 y 12.5 g/L) en relación a todos los tiempos de incubación (tratamiento); gráficamente se puede observar que dichas concentraciones forman líneas horizontales (Figura 15) lo que indica que el área es la misma independientemente del tiempo de incubación. En las concentraciones más altas, sólo no se encuentran diferencias significativas cuando se comparan pares de tiempos sucesivos; sin embargo, conforme aumenta la concentración de RL, las diferencias se hacen más significativas entre los tiempos de incubación (Tabla 7); gráficamente se puede apreciar cómo las rectas se vuelven más empinadas conforme aumenta la concentración de RL (Figura 15).

Tabla 6. Valores de significación de la prueba ANOVA para comparar los resultados de los tiempos de incubación.

Concentración de RL (g/L)	ANOVA sig.
3.125	0.186
6.25	0.695
12.5	0.237
25	0.000*
50	0.000*
100	0.000*
200	0.000*

* Diferencias significativas ($\alpha=0.05$)

Tabla 7. Resultados de la prueba *post-hoc* HSD de Tukey para comparación a pares (I-J) de los tiempos de incubación.

(I)	(J)	Concentración de RL (g/L)			
		25	50	100	200
12h+R	24h+R	0.019*	0.024*	0.014*	0.000*
24h+R	48h+R	0.550	0.000*	0.000*	0.000*
48h+R	72h+R	0.280	0.052 [‡]	0.000*	0.000*
72h+R	96h+R	0.551	0.122	0.053 [‡]	0.000*

+R: 24 horas de refrigeración (post-incubación a 4°C)

* Diferencias significativas ($\alpha=0.05$). Las demás comparaciones a pares (I-J), tienen valores de significación menores a 0.05 por lo que las diferencias son significativas.

‡ Valor de significación de la prueba cercano al límite establecido $\alpha=0.05$

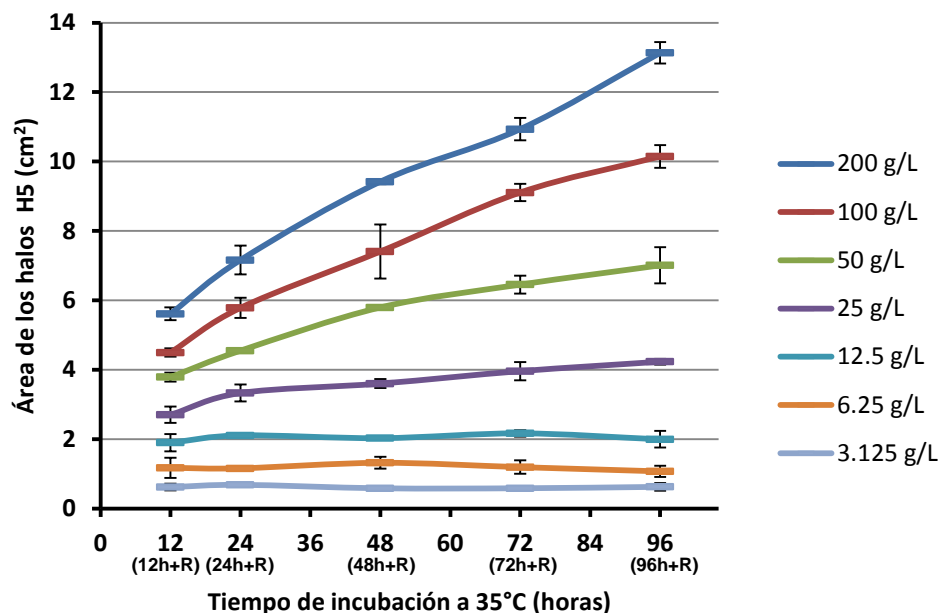


Figura 15. Comparación del área de los halos H5 de diferentes concentraciones de RL a diferentes tiempos de incubación. Barras verticales indican la desviación estándar de cada punto.

Al calcular el ratio RL:CTAB (Tabla 8) en los puntos de “equilibrio” se encontró que no parecía guardar una relación equimolar (1:1) ni tampoco un ratio molar constante, sino más bien un ratio variable dependiente de la concentración.

Tabla 8. Cálculo del ratio molar RL:CTAB en los halos formados con las diferentes concentraciones de RL.

Concentración de RL (g/L)	Área de H5 (cm ²)	Ratio RL:CTAB ^c
3.125	0.635 ^b	1.34
6.25	1.185 ^b	1.44
12.5	2.014 ^b	1.69
25	3.601 ^a	1.89
50	5.796 ^a	2.35
100	7.407 ^a	3.68
200	9.421 ^a	5.78

a. Promedio de las áreas de los halos obtenidos a las 48h+R.

b. Promedio de las áreas de los halos de todos los tiempos al alcanzar el equilibrio.

c. Asumiendo el P.M. promedio del RL como 650.795 g/mol y del CTAB como 364.45 g/mol.

En relación con el efecto de la incubación en frío (+R), la prueba ANOVA (Tabla 9) y la prueba *post-hoc* HSD de Tukey (Tabla 10) mostraron que no existían diferencias significativas entre los tiempos 24h (24 horas a 35°C sin refrigeración) respecto a 12h+R (12 horas a 35°C seguidas de 24 horas de refrigeración), pero sí respecto al mismo periodo pero con refrigeración (24h+R).

Tabla 9. Valores de significación de la prueba ANOVA para comparar el efecto de la incubación 4°C por 24h (+R). Comparación de los tratamientos 24h, 12h+R y 24h+R.

Concentración de RL (g/L)	ANOVA sig.
3.125	0.281
6.25	0.970
12.5	0.232
25	0.013*
50	0.000*
100	0.000*
200	0.001*

* Diferencias significativas ($\alpha=0.05$)

Tabla 10. Resultados de la prueba *post-hoc* HSD de Tukey para comparación a pares (I-J) de los tratamientos 24h, 12h+R y 24h+R.

(I)	(J)	Concentración de RL (g/L)						
		3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
24h	12h+R	0.269	0.988	0.995	0.942	0.065	0.851	0.751
24h	24h+R	0.860	0.968	0.271	0.017*	0.000*	0.000*	0.002*

+R: 24 horas de refrigeración (post-incubación a 4°C)

* Diferencias significativas ($\alpha=0.05$)

Entre los halos de las placas de 24 horas con refrigeración (24h+R) se observa un incremento en el área de entre 24.1% y 27.1% dependiendo de la concentración de RL respecto a los halos de las placas de 24 horas sin refrigeración (24h).

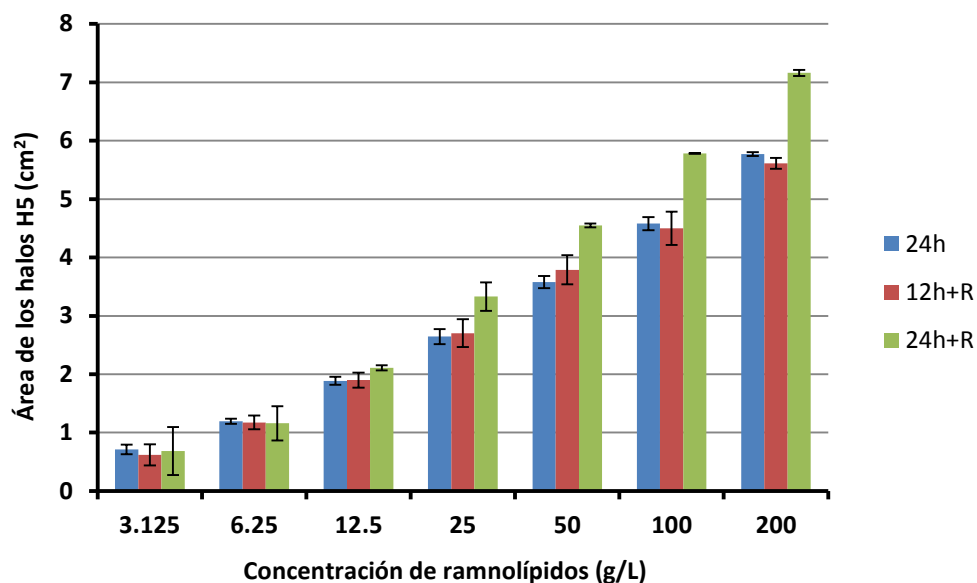


Figura 16. Gráfico comparativo entre el área de los halos de las placas con 24 horas en frío (12h+R y 24h+R) y las no refrigeradas (24h). Barras verticales indican la desviación estándar de cada punto.

En términos cualitativos, el frío ocasiona que el color azul de los halos de acomplejamiento se intensifique (Figura 17); así mismo, la desaceleración de la difusión del RL permite que los halos de precipitación se separen y definan mejor (Figura 18), haciéndose distinguibles algunos halos intermedios (HX.5) (Tabla 1).

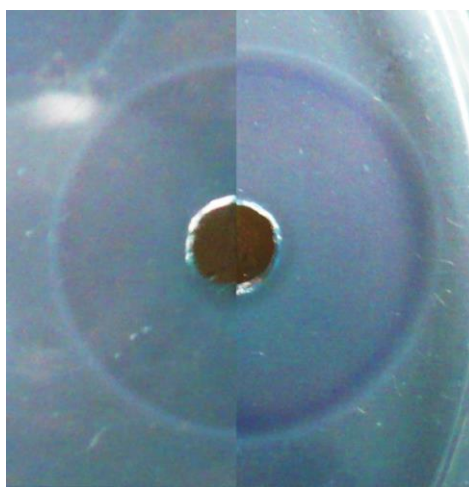


Figura 17. Halo de acomplejamiento sin refrigeración (izquierda) y luego de 24 horas de incubación a 4°C (derecha). Nótese el incremento en el tamaño del halo y la intensificación del color azul.

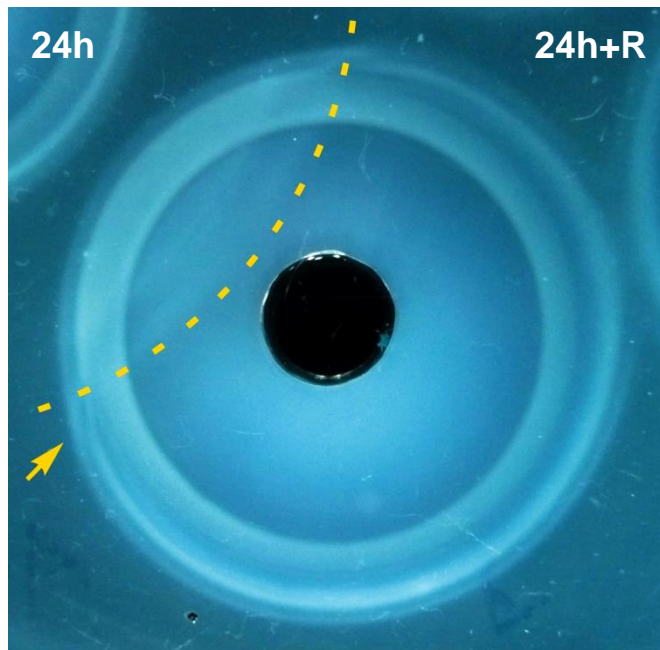


Figura 18. Halos de precipitación obtenidos antes de la refrigeración (izquierda) y luego de la refrigeración (derecha). Nótese la mejor separación de los halos y la formación de nuevos márgenes.

5.6. Evaluación del efecto de la concentración de CTAB en el agar

En general cuanto mayor es la concentración de CTAB, menor es el tamaño de los halos (Figura 19); no obstante, los halos que se forman se aprecian más definidos y nítidos. Por el contrario, concentraciones más bajas de CTAB generan halos más grandes pero tienden a ser más difusos y tenues; en el caso de las placas con 0.05 g/L de CTAB, los halos se observan demasiado difusos para poder siquiera ser medidos con precisión.

En todas las concentraciones el comportamiento de la curva parece ser la misma descrita anteriormente (ver 5.2); pero cuanto mayor es la concentración de CTAB en el medio, el punto de quiebre pareciera desplazarse ligeramente hacia la derecha (hacia una mayor concentración de RL).

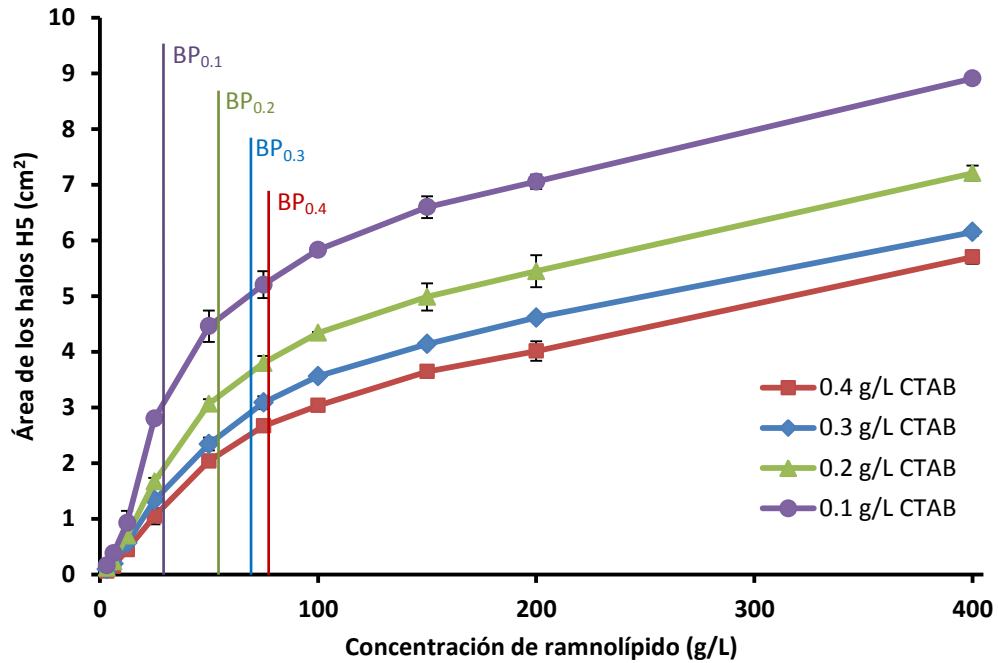


Figura 19. Gráfico del área de los halos H5 en placas de agar CTAB/MB con diferentes concentraciones de CTAB. Líneas indican los puntos de quiebre (BP) aproximados. Barras verticales indican la desviación estándar de cada punto.

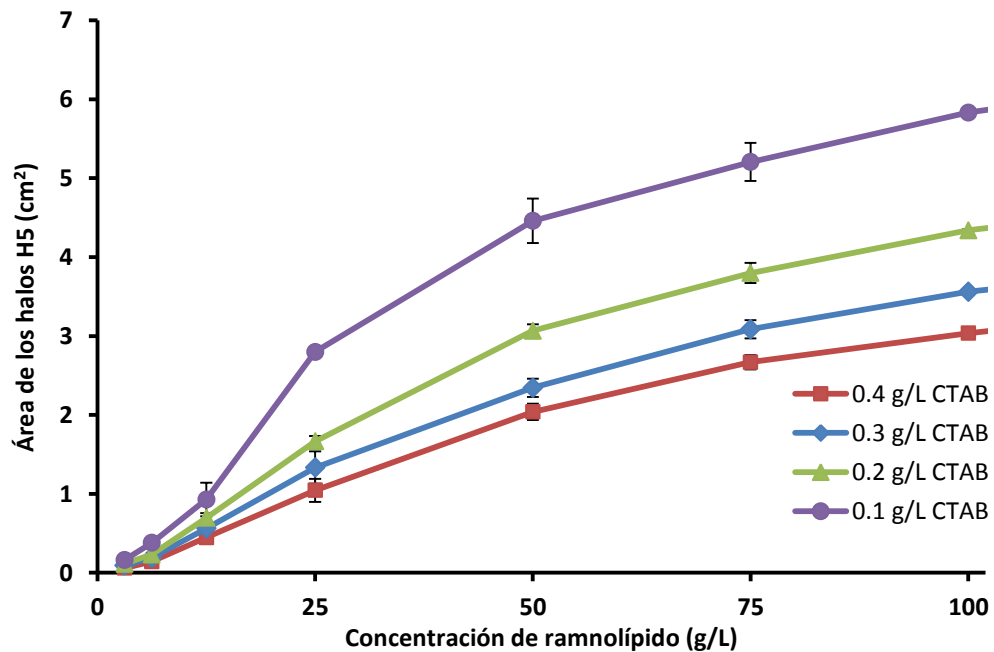


Figura 20. Gráfico del área de los halos H5 en placas de agar CTAB/MB con diferentes concentraciones de CTAB. Detalle de las concentraciones de RL menores a 100 g/L. Barras verticales indican la desviación estándar de cada punto.

Un hallazgo importante respecto al tamaño de los halos, es que la variación en las áreas no es proporcional al cambio en el contenido de CTAB del medio: el incremento entre área de los halos de las placas de 0.3 g/L CTAB y respecto a las de 0.4 g/L, varía entre 7.85% y 54.02% dependiendo de la concentración de RL; entre las de 0.2 g/L respecto a las 0.3 g/L, la variación está entre 17.20% y 30.80%; y entre las 0.1 g/L respecto a las 0.2 g/L, el incremento oscila entre 23.58% y 68.02%.

5.7. Selección de cepas de *Pseudomonas* productoras de RL

Luego de la reactivación de las cepas aisladas de ambientes contaminados con petróleo pertenecientes al banco de cepas del laboratorio, se obtuvo un total de 2517 cepas viables; considerando que del cepario original de 2488 cepas, 516 eran no viables y 492 se disociaron. La preselección dio como resultado que 749 cepas (30%) eran posibles *Pseudomonas* (crecen sobre agar Cetrimide), de las cuales, un tercio eran productoras de biosurfactantes.

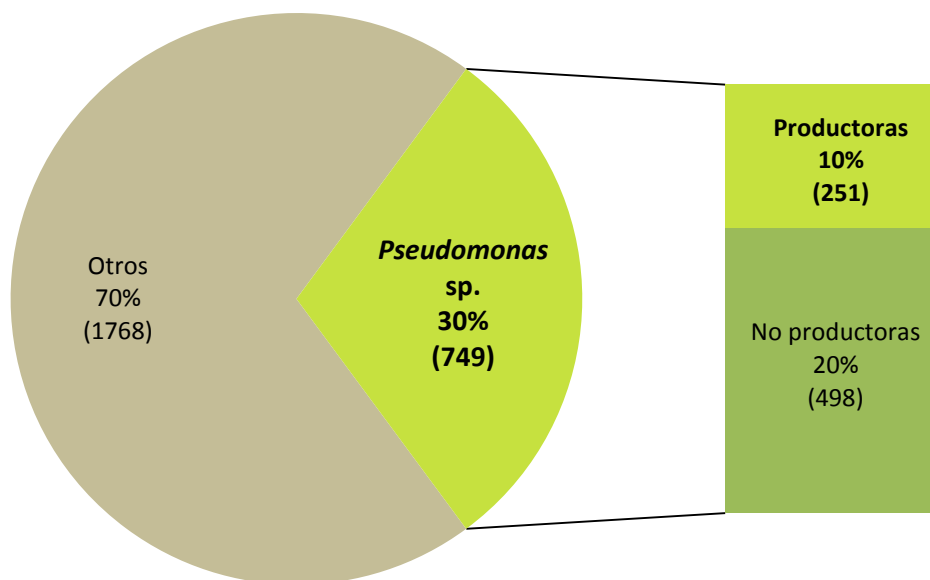


Figura 21. Proporción de cepas reactivadas que pertenecen al género *Pseudomonas* y que son productoras de RL.

De las cepas productoras la gran mayoría era de producción media o baja, mientras que apenas el 8.37% eran relativamente buenos productores (Figura 22). Tras la segunda selección en CTAB/MB con 48 horas de incubación de las 12 mejores productoras del lote anterior, se obtuvo que las cepas presentan niveles de producción de RL relativamente cercanos (Figura 23). Las 3 mejores productoras (IIBT1-1, IIIT1P2 y 6K11) poseen niveles de producción estadísticamente iguales (Tabla 11) y muy cercanos a 25 g/L (haciendo la correlación con el control, asumiendo que en ese rango de concentración de RL, las áreas de los halos presentan un comportamiento prácticamente lineal), adicionalmente su producción era estadísticamente semejante con las 3 siguientes mejores productoras: T2X-2, IIPKA4-1b y 2K-6[i].

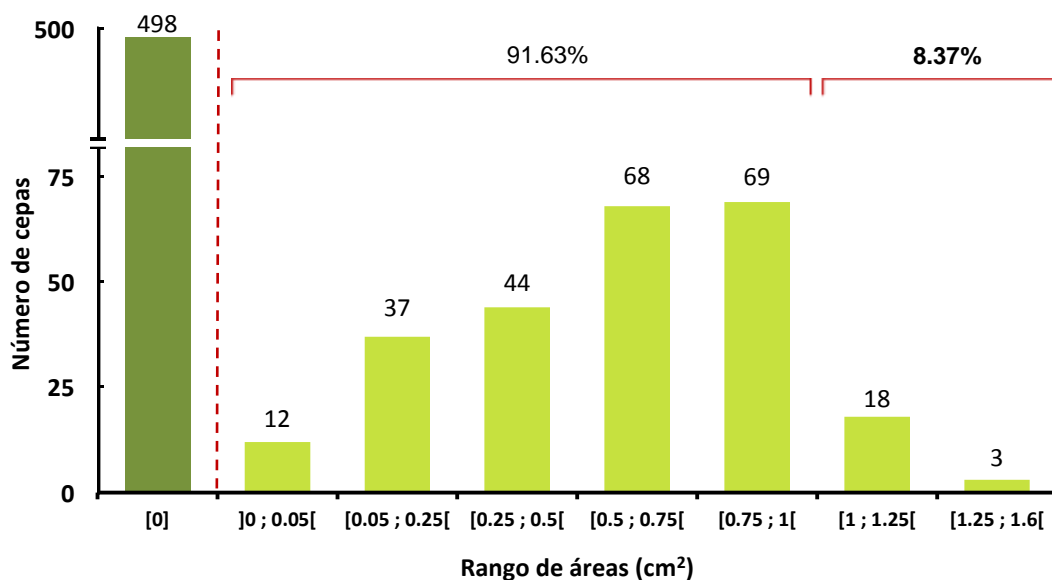


Figura 22. Distribución de las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* en relación al área de sus halos tras la primera etapa de selección.

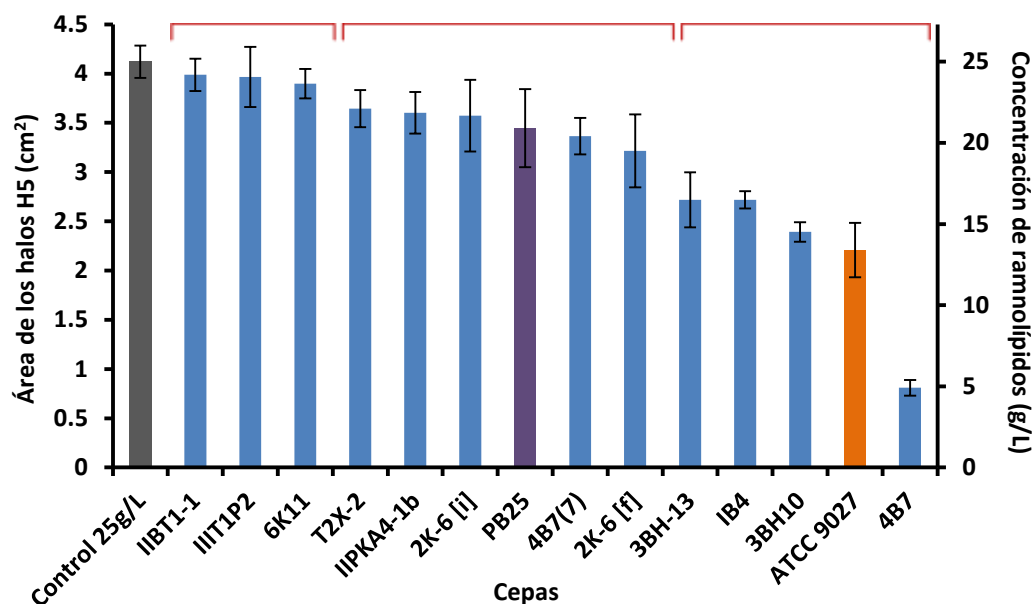


Figura 23. Área de los halos formados por las 12 cepas con mayor producción de RL en placas de agar CTAB/MB tras la segunda etapa de selección. Comparación con una solución de 25 g/L de RL purificado (gris) y las cepas control *Pseudomonas aeruginosa* PB25 (morado) y *P. aeruginosa* ATCC 9027 (naranja). Barras verticales indican la desviación estándar de cada punto.

Tabla 11. Resultados de la prueba *post-hoc* HSD de Tukey para comparación a pares (I-J) de las 12 mejores cepas productoras de RL obtenidas del primer *screening* en relación a las 3 mejores productoras de la última prueba realizada.

Cepas productoras de RL	3 mejores cepas		
	IIBT1-1	IIIT1P2	6K11
IIBT1-1	-	1.000*	1.000*
IIIT1P2	1.000*	-	1.000*
6K11	1.000*	1.000*	-
T2X-2	0.185*	0.273*	0.664*
IIPKA4-1b	0.071*	0.115*	0.395*
2K-6 [i]	0.037	0.062*	0.256*
PB25	0.001	0.002	0.013
4B7(7)	0.000	0.000	0.001
2K-6 [f]	0.000	0.000	0.000
3BH-13	0.000	0.000	0.000
IB4	0.000	0.000	0.000
3BH10	0.000	0.000	0.000
ATCC 9027	0.000	0.000	0.000
4B7	0.000	0.000	0.000

* Sin diferencias significativas ($\alpha=0.05$)

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Nuevo método de revelado de las placas

Con el método convencional, la producción de ramnolípidos se verifica mediante la formación de halos azules alrededor de las colonias/pocillos. La formación de estos halos posiblemente se deba a la interacción iónica y acomplejamiento entre RL, CTAB y MB, y a una posible interacción redox con el MB (lo que le da el color azul característico); no obstante, el mecanismo exacto aún no ha sido dilucidado.

Los RL son de alguna manera moléculas complejas, por lo que la formación del complejo CTAB/MB-RL no lo inmoviliza totalmente y el RL puede seguir difundiendo, por lo tanto el tamaño de los halos dependerá del momento exacto en el cual son medidos, es por eso que aparenta que estar en un estado transicional tiempo-dependiente (Pinzon & Ju, 2009a).

Mientras el método original simplemente verifica la formación de halos azules alrededor de las colonias/pocillos, muchas veces es difícil distinguir los bordes o los halos en sí; el nuevo método hace que los halos sean más fáciles de observar y de medir. Este nuevo método de revelado se basa en hacer precipitar los ramnolípidos previamente acomplejados dentro de los halos mediante la disminución del pH. El pKa de los RL está alrededor de 4.28~5.50 dependiendo de su estructura predominante y su concentración (Lebrón-Paler, et al., 2006). A pH bajo, los RL pierden su carga negativa y se rompen las interacciones electrostáticas del CTAB/MB-RL. A pH incluso menor (<2), el exceso de H⁺ parece también alterar la interacción RL-agua, por lo que el RL pierde afinidad por el agua y precipita formando halos blancos (Figura 3).

La precipitación del RL presenta algunas ventajas frente a la técnica convencional: En primer lugar, el hecho de precipitar el RL lo hace insoluble y lo inmoviliza de forma efectiva, por lo que es posible controlar con mayor precisión el tiempo de migración del complejo. En segundo lugar, con la técnica convencional, muchas veces es difícil distinguir los halos dado que ocasionalmente se muestran transparentes o difusos, y en ocasiones la producción de los pigmentos difusibles propios de *Pseudomonas* dificulta aún más la observación de los halos (Pinzon & Ju, 2009b). El nuevo método hace que los halos sean más fáciles de observar y de medir; además, la disminución del pH hace que el agar sea más transparente debido a la reducción del azul de metileno.

Por otra parte, este método permite la observación de un nuevo patrón de halos nunca antes visto o descrito. Usando la técnica convencional, hasta el momento se han descrito tan sólo 5 zonas en los halos (Pinzon & Ju, 2009a); mientras que con la nueva técnica se ha podido visualizar y describir hasta 11 zonas dentro de los halos. Este patrón particular de halos podría corresponder a diferentes grados de interacción entre el CTAB y los diferentes tipos de RL; no obstante, son necesarios mayores estudios para poder determinarlo con seguridad. De hecho, el área de las capas internas (H2, H3) y las capas intermedias (HX.5) tienden a variar dependiendo de la cepa y de las condiciones del proceso de producción y purificación del RL, por lo que se podría suponer que la formación y tamaño de dichas capas está relacionado a las estructuras predominantes que componen la mezcla de RL inoculado. Estructuras diferentes presentan pesos moleculares diferentes y dominios de interacción hidrofóbica/hidrofílica diferente (Figura 24), por lo que es de suponer que presenten comportamientos migratorios diferentes.

En términos prácticos, la medición de los halos internos no es totalmente conveniente debido a la variabilidad que presentan, por ello es preferible la medición

del halo externo (H5) ya que es el único del que se tiene certeza de su presencia y tamaño.

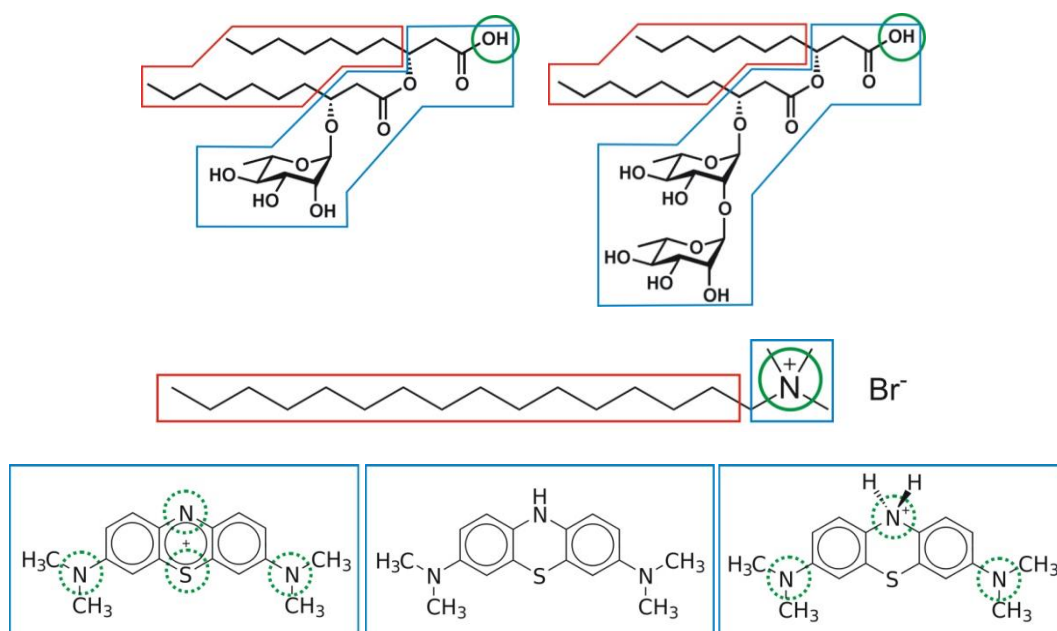


Figura 24. Estructura molecular de un mono-RL y di-RL (arriba), CTAB (centro) y azul de metileno en sus diferentes estados de oxidación (abajo). Recuadro rojo para regiones hidrofóbicas, recuadro azul para regiones hidrofílicas y círculos verdes para residuos capaces de formar interacciones iónicas.

6.2. Relación entre concentración de RL y área de los halos

La medición inicial de las áreas de los halos y la gráfica de sus promedios mostró una curva claramente no-lineal con un punto de quiebre alrededor de 75 a 100 g/L de concentración de RL. Este resultado refuta la aparente linealidad entre la concentración de RL y las áreas de los halos propuesta inicialmente por Siegmund & Wagner (1991) y luego por Pinzon & Ju (2009a); aunque estos últimos posteriormente se rectificaron al manifestar dificultades para correlacionar cuantitativamente de forma precisa ambas variables.

La difusión del RL parece ser dependiente de su concentración: difunde a través del agar hasta que la formación del complejo CTAB/MB-RL ralentiza su migración.

Cuando la concentración de RL se incrementa y sobrepasa la concentración “crítica” (punto de quiebre), la difusión del RL (o del complejo CTAB/MB-RL) se desacelera todavía más.

Este resultado podría explicarse por la naturaleza compleja de la interacción entre el RL, el CTAB y el MB, pues ya no sólo se trataría de una interacción del tipo par-iónico. Más aún, la interacción hidrofóbica CTAB-RL y RL-RL tendría que ser tomada en cuenta también: en concentraciones altas de RL, es probable que la interacción hidrofóbica domine sobre las interacciones hidrofílicas (con el agua) e iónicas (con el CTAB/MB); como resultado, las moléculas presentan comportamientos diferentes y por lo tanto velocidades de migración diferentes.

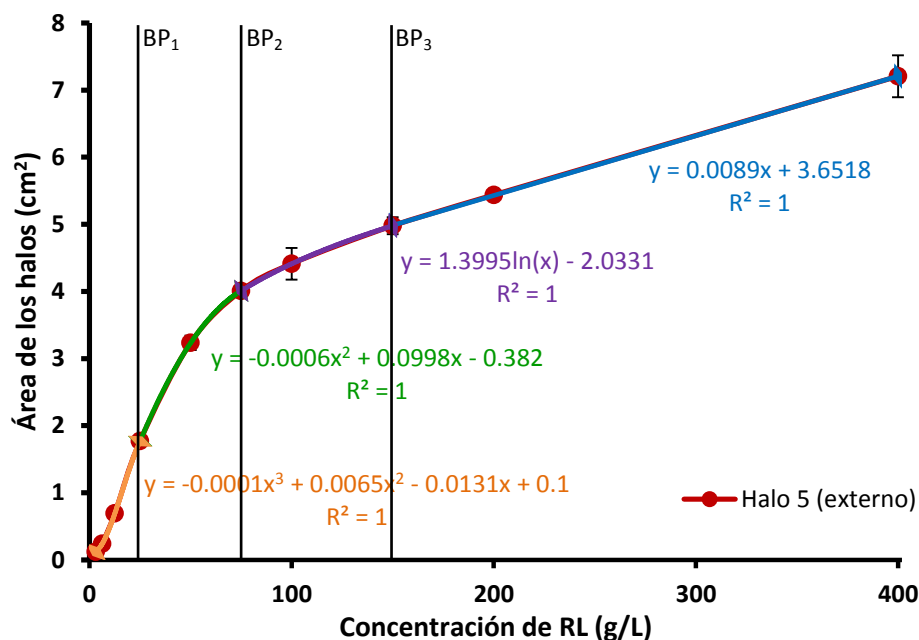


Figura 25. Gráfico del área de los halos de precipitación en placas de agar CTAB/MB. Ubicación aproximada de los puntos de quiebre (BP) y fórmulas de regresión de cada segmento. Barras verticales indican la desviación estándar de cada punto.

Dado que la curva no se ajusta a ningún sistema de regresión simple, matemáticamente sería necesario aplicar una técnica de regresión segmentada (Figura 25) con varios puntos de quiebre (BP: *breakpoint*) y un sistema de ecuaciones de al

menos 3 o 4 elementos (Ecuación 2). Pero, en términos prácticos, el hecho de presentar un comportamiento variable y un patrón de migración de dicha naturaleza, dificulta una correlación precisa entre las áreas de los halos y la concentración de RL. Esto obliga a requerir de otra técnica de cuantificación para un análisis cuantitativo más fino. No obstante, dado que la curva siempre tiene una tendencia ascendente, aún es útil como método de *screening* semi-cuantitativo, ya que si bien no es posible determinar de manera precisa cuánto RL se ha producido, aún es posible comparar y distinguir cepas con productividad significativamente diferentes bajo condiciones similares.

Ecuación 2. Ejemplo de un sistema de ecuaciones que concuerda con la curva del área de los halos H5. $f(x)$: Área de los halos (cm²); x : Concentración de RL (g/L).

$$f(x) = \begin{cases} -0.0001x^3 + 0.0065x^2 - 0.0131x + 0.1000, & 0 < x \leq 25 \\ -0.0005x^2 + 0.0930x - 0.2799, & 25 < x \leq 75 \\ 1.3995 \cdot \ln(x) - 2.0331, & 75 < x \leq 150 \\ 0.0089x + 3.6518, & 150 < x \leq 400 \end{cases}$$

6.3. Evaluación del efecto del azul de metileno en el agar

El azul de metileno (MB) es un componente catiónico clave en la técnica convencional ya que la producción de RL se verifica mediante de la formación de los halos azules característicos. El sutil cambio del color azul en el agar posiblemente se deba a la ligera variación de la absorbancia del azul de metileno luego de la formación el complejo CTAB/MB-RL (Pinzon & Ju, 2009a) o a un cambio redox del MB; no obstante el mecanismo aún no se ha dilucidado por completo.

Con la nueva técnica de revelado, no es estrictamente primordial que se visualicen los halos de color azul, dado que con el uso de HCl el color azul finalmente se pierde o se oculta tras los halos de precipitación opacos. Si bien podría pensarse que el uso del MB podría ser no del todo necesario; la verdad es que se ha podido observar que los

halos de precipitación que se forman en las placas sin MB se muestran difusos, llegando al punto que a veces ni siquiera se distinguen ni se diferencian los halos internos (Figura 9). La importancia del MB, pues, no sólo radica en la formación de color sino también en la formación del propio complejo CTAB/MB-RL que ralentiza la migración del CTAB, lo que verifica la importancia del uso del MB en la técnica tanto la convencional como la modificada.

6.4. Influencia del diámetro de los pocillos y el volumen de inóculo

Dado que no se encontraron diferencias significativas en el área de los halos en relación al tamaño de los pocillos para un mismo volumen de inóculo (10 µl), se llegó a la conclusión que es más conveniente el trabajo con un diámetro de 5.5 mm, ya que es más sencillo trabajar con pocillos de mayor tamaño, tanto al momento de hacer las perforaciones como al momento de la inoculación. Así mismo, los pocillos de mayor tamaño permiten la inoculación de mayor cantidad de volumen sin que se derrame accidentalmente líquido fuera del pocillo.

Por su parte, la prueba de regresión lineal del área de los halos respecto al volumen del inóculo, mostró un parámetro R^2 por encima de 0.96 lo que indica una aparente relación lineal. No obstante, a mayores concentraciones y mayores volúmenes, una distorsión en las curvas se hace evidente, lo que concuerda con el particular comportamiento de la migración de los RL descrito anteriormente en relación a su concentración (ver 5.2). Se estableció como volumen ideal 20 µl para los pocillos de 5.5 mm de diámetro ya que es un volumen significativo para trabajar y reduce ligeramente la distorsión que podría ser causada por el aumento de la cantidad de RL.

En relación a la equivalencia de cantidad de RL inoculado con respecto al volumen, el hecho de encontrar diferencias significativas entre las medias de las área

de los halos H3, H3.5, H4 y H5 de diferentes inóculos cuyo contenido de RL (concentración x volumen) era supuestamente el mismo, indica que la migración de los RL está más en función de su concentración a determinado volumen y no a su cantidad neta (masa o moles) y que el tamaño del halo está más influenciado por la concentración de RL que por el volumen inoculado.

6.5. Evaluación del tiempo de incubación y del efecto del frío

El tiempo de incubación de las placas es determinante en el tamaño de los halos. Anteriormente ya se había descrito la difusión de los RL como un estado transicional tiempo-dependiente (Pinzon & Ju, 2009a). Las gráficas (Figura 13 y Figura 14) muestran que a mayor tiempo de incubación mayor tamaño alcanzan los halos; sin embargo, los resultados de esta prueba también muestran que existe la posibilidad que haya un “área de máxima migración” donde la inmovilización de los ramnolípidos es total.

La difusión del RL parece ser proporcional al tiempo de incubación pero dependiente de la concentración de RL (Figura 15) ya que las concentraciones más altas tienden a migrar más rápido en un tiempo determinado. Luego, la velocidad de difusión pareciera experimentar una ligera desaceleración en el momento que el área del halo se acerca a su “máximo”, momento en que finalmente la difusión aparentemente se detiene.

El RL de las concentraciones más bajas (3.125; 6.25 y 12.5 g/L) aparentemente logra quedar inmovilizado dentro de las 12 horas de incubación a 35°C y 24 horas a 4°C (12h+R), alcanzando una supuesta relación lineal entre la concentración del RL y el área de los halos formados; a diferencia del RL de las concentraciones mayores a 25 g/L el cual no logra siquiera acercarse a punto de inmovilización en el tiempo

máximo programado en el experimento (96h+R: 96h a 35°C y 24h a 4°C); es por ello que se sospecha que las concentraciones más altas requerirían progresivamente de muchísimo mayor tiempo para alcanzar sus respectivas “áreas de máxima migración”. Teniendo en cuenta esto, no resulta práctico intentar incubar las placas por tantos días ya que el tiempo invertido sería excesivo y adicionalmente el agar se deshidrataría demasiado, afectando notablemente la eficacia de la prueba.

Por otra parte, es probable que las aparentes “áreas de máxima migración” estén relacionadas al contenido de CTAB en las placas; no obstante, al calcular el ratio RL:CTAB de dichos puntos (Tabla 8) se encontró que no parecía guardar una relación equimolar (1:1) ni tampoco un ratio molar constante, sino más bien un ratio variable dependiente de la concentración de RL. Este resultado concuerda con lo obtenido por Pinzon y Ju (2009a) al calcular los ratios de acomplejamiento molar (*molar complexation ratio*) RL:CTAB+MB de los halos obtenidos a 48 horas de incubación, lo que una vez más representa una dificultad para poder correlacionar cuantitativamente el área de los halos y la concentración de RL.

En términos prácticos, el tiempo de incubación ideal sería de 48 horas ya que es el mínimo tiempo necesario para que por lo menos las concentraciones menores a 25 g/L alcancen su “áreas de máxima migración” o estén muy cercanos a este; lo que nos asegura que los halos formados en dichas concentraciones de RL hayan alcanzado su tamaño máximo aparente y de esa forma poder reducir un poco la variación causada por el tiempo de incubación variable y contrarrestar de alguna manera el estado transicional tiempo-dependiente del RL a concentraciones menores a 25 g/L. Esto es de utilidad si se quiere utilizar la técnica como método de *screening* semi-cuantitativo ya que permitiría la estimación de la concentración de RL producido por las cepas en un tiempo determinado siempre y cuando no supere los 25 g/L. Afortunadamente, la

producción de RL de las cepas silvestres recién aisladas por lo general está muy por debajo de los 25 g/L de RL cuando se utiliza glicerol como fuente de carbono: en promedio la producción de una cepa considerada buena productora ronda los 5–12 g/L (Giraldo, 2012; Wei, *et al.*, 2005; Chen, *et al.*, 2007; Rahman, *et al.*, 2002; Pinzon, 2009; Santos, *et al.*, 2002; Onwosi & Odibo, 2012; Centeno da Rosa, *et al.*, 2010; Wu, *et al.*, 2008; Sylđatk, *et al.*, 1985); aunque también se ha reportado más de 100 g/L de producción, eso se logra en cultivos optimizados y/o con otras fuentes de carbono (Abdel-Mawgoud, *et al.*, 2011).

En relación con el efecto de la incubación en frío, los resultados de la prueba ANOVA (Tabla 9) y la prueba *post-hoc* HSD de Tukey (Tabla 10) mostraron que el RL sigue difundiendo a pesar que la temperatura disminuye, pero lo hace a menor velocidad, por lo que aproximadamente 12 horas a 35°C equivaldrían a 24 horas en frío (4°C). En términos cualitativos, la post-incubación a 4°C presenta también ventajas adicionales, ya que no sólo intensifica el color azul de los halos de acomplejamiento (Gunther IV, *et al.*, 2005; Pinzon & Ju, 2009a); sino que ayuda a separar y definir mejor los halos de precipitación, permitiendo diferenciar algunos halos intermedios.

6.6. Evaluación del efecto de la concentración de CTAB en el agar

Respecto a la variación de la concentración de CTAB en el agar, se obtuvieron resultados semejantes a los obtenidos por Pinzon y Ju (2009a); aunque a diferencia de ellos, con la nueva técnica de revelado sí fue posible detectar RL con concentraciones menores a 50 g/L para placas con CTAB a 0.4 g/L y 0.3 g/L.

En general, cuanto mayor es la concentración de CTAB, menor es el tamaño de los halos y la capacidad de discriminación entre concentraciones de RL cercanas disminuye; no obstante, los halos que se forman se aprecian más definidos y nítidos.

Por el contrario, concentraciones más bajas de CTAB permiten mejor discriminación para concentraciones de RL más pequeñas, pero los halos tienden a ser más difusos y tenues, sobre todo para las concentraciones más altas de RL.

El aparente desplazamiento hacia la derecha del punto de quiebre (hacia una mayor concentración de RL) conforme aumenta la concentración de CTAB en el medio, podría ser un posible indicio de la existencia de un punto de saturación del CTAB y que el cambio en el comportamiento de la velocidad de difusión del RL estaría relacionado con el contenido de CTAB del medio y por lo tanto con la interacción RL-CTAB.

Un hallazgo importante respecto al tamaño de los halos, es que la variación en las áreas no es proporcional al cambio en el contenido de CTAB del medio, este resultado, concordaría con el hecho que el ratio RL:CTAB no es constante. Este hecho evidencia que la concentración del CTAB es una variable importante a tener en cuenta ya que afecta directamente la difusión del RL. Dado que el número de moléculas de cada especie que interviene en el complejo y el número de interacciones que se dan es difícil de estimar en un momento dado, se vuelve muy complicado establecer una correlación exacta entre contenido de CTAB en el agar y tamaño de los halos formados a determinada concentración de RL; lo más práctico en este caso sería establecer la concentración de CTAB en un valor constante y ajustar los demás parámetros de la técnica en función de eso.

Para efectos de la aplicación de la técnica se vio conveniente la utilización de CTAB a una concentración de 0.2 g/L, coincidentemente la misma concentración que originalmente emplearon Siegmund y Wagner (1991), ya que logra un equilibrio entre capacidad de discriminación a concentraciones más bajas de RL, y la nitidez y definición de halos formados.

6.7. Parámetros ideales de trabajo con el método del agar CTAB/MB

Debido a la dificultad de correlacionar de forma precisa la concentración de RL y el área de los halos formados podría decirse que el método de agar CTAB/MB no es muy apropiado para un análisis cuantitativo fino de la producción de RL. La difusión del RL no parece tener un comportamiento simple y existen numerosos factores que afectan la velocidad de migración del RL y el área final de los halos, tales como la concentración del CTAB, concentración del RL que difunde, la cantidad de moléculas involucradas en el complejo CTAB/MB-RL, el espesor del agar, el tiempo de incubación, la temperatura de incubación, etc. Pinzón y Ju (2009a) llegaron a una conclusión similar pero por motivos diferentes luego de analizar otras variables y presentárseles otros problemas.

A pesar de todo, esta técnica todavía es muy útil para una pre-selección semi-cuantitativa de cepas productoras de RL. Dadas las características de la técnica, si bien no es posible determinar de manera precisa cuánto RL se ha producido, aún es posible diferenciar cepas con productividad significativamente diferentes bajo condiciones similares; aunque la técnica aún no es “suficientemente cuantitativa” para lograr discriminar con precisión cepas con productividad similar.

En términos prácticos, los valores de las variables analizadas independientemente que dieron como resultado una mejor resolución y definición de los halos formados, se establecieron en 5.5 mm de diámetro del pocillo, 20 µl de inóculo, 48 horas de incubación a 35°C seguido de 24 horas a 4°C y 15 ml de agar por placa con 0.2 g/L de CTAB y 0.005 g/L de azul de metileno. Bajo esas condiciones existe un rango de concentraciones de RL (<25 g/L) donde las áreas de los halos presentan un comportamiento aparentemente lineal y donde la técnica podría ser aplicada como un método cuantitativo de forma efectiva; afortunadamente, la producción de RL de la gran mayoría de cepas silvestres no sobrepasa ese rango a las condiciones de cultivo

establecidas en este trabajo si se utiliza glicerol como fuente de carbono. Si además se hace uso de controles positivos y negativos (soluciones patrón de RL), podría corregirse las variaciones causadas por factores intrínsecos a cada prueba y cada réplica que son difíciles de controlar con precisión (humedad de la placa, profundidad exacta del agar, etc.).

6.8. Selección de cepas de *Pseudomonas* productoras de RL

Tras la reactivación de las cepas aisladas de ambientes contaminados con petróleo no es sorpresiva la presencia de un gran número de *Pseudomonas*, ya que este género representa uno de los principales grupos de bacterias degradadoras de hidrocarburos; y de hecho, constituyen el grupo de bacterias mejor conocidas capaces de utilizar hidrocarburos como fuente de energía y producir biosurfactantes (Jahangeer & Kumar, 2013; Das & Mukherjee, 2006; Leahy & Colwell, 1990).

Tras la aplicación de la técnica, se logró seleccionar a un grupo bastante reducido de cepas. De dicho grupo, las 3 mejores productoras (IIBT1-1, IIIT1P2 y 6K11) poseían niveles de producción estadísticamente iguales y estadísticamente semejantes a las 3 siguientes mejores productoras T2X-2, IIPKA4-1b y 2K-6[i]. A este nivel, si se deseara seleccionar solamente a “la mejor” productora sería necesario la aplicación de algún otro método cuantitativo más exacto y/o la evaluación de otros parámetros como velocidad de crecimiento o rendimiento en función del sustrato. No obstante, La aplicación de esta técnica (con la modificación ya mencionada) permitió reducir el número candidatos de 2517 cepas potenciales a tan solo 3 cepas superproductoras (0.12%) a pesar de las limitaciones matemáticas. Este hecho confirma la utilidad y capacidad del método del agar CTAB/MB modificado como una buena técnica de *screening* inicial para cepas de *Pseudomonas* spp. productoras de ramnolípidos.

VII. CONCLUSIONES

- Este trabajo evidencia nuevamente que el método de agar CTAB/MB no posee un carácter suficientemente cuantitativo que permita correlacionar de forma precisa la concentración de RL y el área de los halos.
- Esta técnica todavía es muy útil para una pre-selección semi-cuantitativa de cepas productoras de RL. Dadas las características de la técnica es posible diferenciar cepas con productividad significativamente diferentes bajo condiciones similares.
- Los valores de las variables analizadas que independientemente resultaron en una mejor resolución y definición de los halos formados, se establecieron en 5.5 mm de diámetro del pocillo, 20 µl de inóculo, 48 horas de incubación a 35°C seguido de 24 horas a 4°C y 15 ml de agar por placa con 0.2 g/L de CTAB y 0.005 g/L de azul de metileno.
- Se desarrolló un nuevo método de revelado del RL: la disminución del pH usando HCl precipita el RL dentro de los halos y los hace más fáciles de distinguir y medir en comparación con el método original. Este nuevo método de revelado ha permitido la observación de un nuevo patrón de halos alrededor de los pocillos que presenta hasta 11 zonas distinguibles.
- La modificación de la técnica del agar CTAB/MB propuesta en este trabajo, facilita la aplicación de la misma como método de *screening* inicial para cepas de *Pseudomonas* spp. superproductoras de ramnolípidos; haciendo uso de esta técnica se logró detectar 3 cepas superproductoras dentro de un *pool* de 2517 cepas.

VIII. RECOMENDACIONES

Un hecho que dificulta la optimización de esta técnica, es que aún se desconoce el mecanismo exacto de la formación del complejo CTAB/MB-RL, la composición exacta de dicho complejo y la naturaleza de sus interacciones. Debido a ello, tampoco es posible deducir con certeza la naturaleza ni la composición de los nuevos halos descubiertos tras la aplicación del nuevo método de revelado; no obstante, este hallazgo podría representar un punto de partida para futuras investigaciones: si se logra determinar la composición de los diferentes halos de precipitación formados podría contribuir a dilucidar finalmente la naturaleza del complejo CTAB/MB-RL.

Otro detalle importante a tomar en cuenta es que los RL producidos por una cepa son en realidad una mezcla de diversos tipos y variantes de RL. Actualmente, la técnica del agar CTAB/MB no tiene la capacidad de distinguirlos (y en realidad la única forma de determinarlo en la actualidad es mediante técnicas sofisticadas de cromatografía y/o espectrometría) pero si se lograra determinar que los diferentes halos de precipitación corresponden efectivamente a diferentes tipos de RL, esta simple modificación a la técnica podría simplificar el trabajo de caracterización de los RL producidos por una cepa.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abalos, A., Maximo, F., Manresa, M. A. & Bastida, J., 2002. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Volumen 77, pp. 777-784.
- [2] Abdel-Mawgoud, A. M. y otros, 2011. Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production. En: G. Soberón-Chávez, ed. *Biosurfactants*. Verlag Berlin Heidelberg: Springerlink-Verlag, p. 216.
- [3] Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N. & Croughan, T. P., 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene*, Volumen 160, pp. 63-67.
- [4] Ara, I., 2007. Conversion of Cr(VI) in Water and Soil Using Rhamnolipids. *Tesis de Maestría en Ciencias Aplicadas, Concordia University, Montreal-Canadá*.
- [5] Arino, S., Marchal, R. & Vandecasteele, J. P., 1996. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volumen 45, pp. 162-168.
- [6] Arnaut de Toledo, V. d. A. y otros, 2012. Spectrophotometry as a Tool for Dosage Sugars in Nectar of Crops Pollinated by Honeybees. En: J. Uddin, ed. *Macro To Nano Spectroscopy*. s.l.:InTech, pp. 269-290.
- [7] Ballot, F., 2009. Bacterial Production of Antimicrobial Biosurfactants. *Tesis de Maestría en Ciencias (Ingeniería Química), University of Stellenbosch, Stellenbosch-Sudáfrica*.
- [8] Barrios, Y., 2011. Bioremediation: a tool for the management of oil pollution in marine ecosystems. *Biotecnología Aplicada*, Volumen 28, pp. 69-76.
- [9] BCRP, 2013. *Indicadores Económicos II Trimestre 2013*, Lima: BCRP.
- [10] Benavides, J. y otros, 2006. Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA*, 4(5), pp. 1-116.
- [11] Benincasa, M., 2007. Rhamnolipid Produced from Agroindustrial Wastes Enhances Hydrocarbon Biodegradation in Contaminated Soil. *Current Microbiology*, Volumen 54, p. 445-449.
- [12] Bodour, A. A., Drees, K. P. & Maier, R. M., 2003. Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), pp. 3280-3287.
- [13] Borgund, A. E., Erstad, K. & Barth, T., 2007. Normal phase high performance liquid chromatography for fractionation of organic acid mixtures extracted from crude oils. *Journal of Chromatography A*, Volumen 1149, p. 189-196.
- [14] Burger, M. M. y otros, 1966. Formation of rhamnolipids of *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Enzymology*, Volumen 8, p. 441-445.
- [15] Canasa Calvo, A., 2011. Remediación de suelos contaminados en operaciones de perforación y manejo del petróleo crudo en la selva peruana. *Tesis de Licenciatura en Ingeniería, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima-Perú*.
- [16] Centeno da Rosa, C. F., Mariano Michelin, F. d. M. B. J., Juliano Kalil, S. & Veiga Burkert, C. A., 2010. Production of a rhamnolipid-type biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 grown on glycerol. *African Journal of Biotechnology*, 9(53), pp. 9012-9017.

- [17] Chandrasekaran, E. V. & BeMiller, J. N., 1980. Constituent analysis of Glycosaminoglycans. En: R. L. Whistler & J. N. BeMiller, edits. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. New York: Academic Press, p. 89–96.
- [18] Chayabutra, C. & Ju, L. K., 2001. Polyhydroxyalkanoic acids and rhamnolipids are synthesized sequentially in hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *Biotechnology Progress*, 17(3), pp. 419-23..
- [19] Chayabutra, C., Wu, J. & Ju, L. K., 2011. Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* Under Denitrification: Effects of Limiting Nutrients and Carbon Substrates. *Biotechnology & Bioengineering*, 72(1), pp. 25-33.
- [20] Chen, C. Y., Baker, S. C. & Darton, R. C., 2007. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *Journal of Microbiological Methods*, Volumen 70, pp. 503-510.
- [21] Chen, F., Chen, C. C., Riadi, L. & Ju, L. K., 2004. Modeling rhl Quorum-Sensing Regulation on Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology Progress*, Volumen 20, pp. 1325-1331.
- [22] Chen, S. Y. y otros, 2007. Improved Production of Biosurfactant with Newly Isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Biotechnology Progress*, Volumen 23, pp. 661-666.
- [23] Choe, B. Y., Krishna, N. R. & Pritchard, D. G., 1992. Proton NMR Study on Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, Volumen 30, pp. 1025-1029.
- [24] Choi, K. H. & Schweizer, H. P., 2005. An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMC Microbiology*, 5(30).
- [25] Christofi, N. & Ivshina, I. B., 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, Volumen 93, p. 915–929.
- [26] Christova, N. y otros, 2004. Rhamnolipid Biosurfactants Produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN. *Zeitschrift für Naturforschung*, Volumen 59c, pp. 70-74.
- [27] Chrzanowski, L., Lawniczak, L. & Czaczyk, K., 2012. Why do microorganisms produce rhamnolipids?. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volumen 28, pp. 401-419.
- [28] Clarke, K. G., Ballot, F. & Reid, S. J., 2010. Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under phosphate limitation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12), pp. 2179-2184.
- [29] Cooper, D. G. & Goldenberg, B. G., 1987. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), pp. 224-229.
- [30] Cornelis, P., ed., 2008. *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. 1° ed. Bruselas: Caister Academic Press.
- [31] Das, K. & Mukherjee, A. K., 2006. Crude petroleum-oil biodegradation eYciency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*.
- [32] Das, N. & Chandran, P., 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, Volumen 2011.
- [33] De Koster, C. G. y otros, 1994. High-performance Thin-layer Chromatography/Fast Atom Bombardment (Tandem) Mass Spectrometry of *Pseudomonas* Rhamnolipids. *Biological Mass Spectroscopy*, Volumen 23, p. 179–185.
- [34] Desai, J. D. & Banat, I. M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), p. 47–64.
- [35] Déziel, E. y otros, 1999. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1440(2-3), p. 244–252.
- [36] Déziel, E. y otros, 1996. Biosurfactant production by a soil *pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), pp. 1908-1912.

- [37] Dische, Z. & Shettles, L. B., 1948. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *Journal of Biological Chemistry*, Volumen 175, pp. 595-603..
- [38] Dusane, D. H. y otros, 2010. Quorum sensing: implications on rhamnolipid. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Volumen 27, pp. 159-184.
- [39] El Comercio, 2013. *El Comercio.pe*. [En línea] Available at: <http://elcomercio.pe/tag/136325/derrame-de-petroleo> [Último acceso: 16 10 2013].
- [40] EL-Amine Bendaha, M. y otros, 2012. Isolation and Comparison of Rhamnolipids Production in *Pseudomonas aeruginosa* P.B:2 and *Pseudomonas fluorescens* P.V:10. *Open Access Scientific Reports*, 1(12).
- [41] Elouzi, A. A., Akasha, A. A., Elgerbi, A. M. & El Gammudi, B. A., 2012. Using of Microbial Bio-Surfactants (Rhamnolipid) in Heavy Metals Removal from Contaminated Water. *Journal of Sebha University -Pure and Applied Sciences*, 11(1), pp. 85-95.
- [42] Escalante, R. M., 2002. Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios. *Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú*.
- [43] Evans, G. & Furlong, J., 2003. *Environmental Biotechnology: Theory and Application*. Londres: John Wiley & Sons Ltd.
- [44] Garrity, G. M. ed., 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. 2° ed. New York: Springer-Verlag New York, Inc..
- [45] Gartshore, J., Lim, Y. C. & Cooper, D. G., 2000. Quantitative analysis of biosurfactants using Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy. *Biotechnology Letters*, Volumen 22, pp. 169-172.
- [46] Gebhard, S., Hümpel, A., McLellan, A. D. & Cook, G. M., 2008. The alternative sigma factor SigF of *Mycobacterium smegmatis* is required for survival of heat shock, acidic pH and oxidative stress. *Microbiology*, 154(9), pp. 2786-2795 .
- [47] George, S. & Jayachandran, K., 2009. Analysis of Rhamnolipid Biosurfactants Produced Through Submerged Fermentation Using Orange Fruit Peelings as Sole Carbon Source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volumen 158, p. 694–705.
- [48] Ghomi Avili, M., Fazelipour, M. H., Jafari, S. A. & Seyed, 2012. Comparison between batch and fed-batch production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 10(4), pp. 263-269.
- [49] Giraldo, J. D., 2012. Producción de Rhamnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* PB25: Evaluación de su Actividad Emulsificante y de Remoción de Metales Pesados. *Tesis de Licenciatura en Biología (Microbiología y Parasitología), Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú*.
- [50] Giraldo, J. D., Gutiérrez, S. & Merino, F., 2014. Actividad emulsificante y de remoción de metales pesados del rhamnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(1), pp. 35-44.
- [51] Guerra-Santos, L., Kappeli, O. & Fiechter, A., 1984. *Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture with Glucose as Carbon Source. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(2), pp. 301-305.
- [52] Guerra-Santos, L., Kappeli, O. & Fiechter, A., 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volumen 24, p. 443–448.
- [53] Gunther IV, N. W., Nuñez, A., Fett, W. & Solaiman, D. K. Y., 2005. Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), p. 2288–2293.
- [54] Gunther IV, N. W., Nuñez, A., Fortis, L. & Solaiman, D. K. Y., 2006. Proteomic based investigation of rhamnolipid production by *Pseudomonas chlororaphis* strain NRRL B-30761. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Volumen 33, p. 914–920.

- [55] Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y. & Shutsubo, K., 1999. Petroleum Biodegradation in Marine Environments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1(1), pp. 63-70.
- [56] Haussler, S. y otros, 1998. Purification and Characterization of a Cytotoxic Exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and Immunity*, Volumen 66, p. 1588–1593.
- [57] Hazra, C. y otros, 2011. Screening and identification of *Pseudomonas aeruginosa* AB4 for improved production, characterization and application of a glycolipid biosurfactant using low-cost agro-based raw materials. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Volumen 86, p. 185–198.
- [58] Helbert, J. R. & Brown, K. D., 1957. Color Reaction of Anthrone with Monosaccharide Mixtures and Oligo- and Polysaccharides Containing Hexuronic Acids. *Analytical Chemistry*, 29(10), p. 1464–1466.
- [59] Herman, D. C., Zhang, Y. & Miller, R. M., 1997. Rhamnolipid (Biosurfactant) Effects on Cell Aggregation and Biodegradation of Residual Hexadecane under Saturated Flow Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), p. 3622–3627.
- [60] Heyd, M., 2009. Continuous production of rhanolipids by means of process integration. *Tesis de Doctorado en Ingeniería, Universität Fridericiana Karlsruhe, Karlsruhe-Alemania*.
- [61] Heyd, M. y otros, 2008. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Volumen 391, p. 1579–1590.
- [62] Hisatsuka, K., Nakahara, T., Sano, N. & Yamada, K., 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*: its function in hydrocarbon fermentations. *Agricultural and Biological Chemistry*, Volumen 35, p. 686–692.
- [63] Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. & Schweizer, H. P., 1998. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, Volumen 212, p. 77–86.
- [64] Holmberg, K., 2003. *Novel Surfactants: Preparation Applications and Biodegradability*. Segunda Edición ed. New York: CRC Press.
- [65] Hwang, S. & Cutright, T. J., 2002. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. *Chemosphere*, Volumen 47, p. 891–899.
- [66] Jadhav, M. U., Kalme, S. D., Tamboli, D. P. & Govindwar, S. P., 2011. Rhamnolipid from *Pseudomonas desmolyticum* NCIM-2112 and its role in the degradation of Brown 3REL. *Journal of Basic Microbiology*.
- [67] Jahangeer & Kumar, V., 2013. An Overview on Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants. *International Journal of Engineering and Technical Research*, 1(8), pp. 34-37.
- [68] Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H. & Trevors, J. T., 1991. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, Volumen 13, pp. 271-279.
- [69] Jarvis, F. G. & Johnson, M. J., 1949. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*, Volumen 71, p. 4124–4126.
- [70] Jurado, E. y otros, 2006. Simplified spectrophotometric method using methylene blue for determining anionic surfactants: Applications to the study of primary biodegradation in aerobic screening tests. *Chemosphere*, Volumen 65, p. 278–285.
- [71] Kapadia Sanket, G. & Yagnik, B., 2013. Current Trend and Potential for Microbial Biosurfactants. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 4(1), pp. 1-8.
- [72] Khochage, L., 2010. Rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* Strains screening isolation and antimicrobial activity. *Tesis de Maestría en Farmacia (Biotecnología Farmacéutica), Rajiv Gandhi University of Health Sciences, Karnataka-India*.

- [73] Klosowska-Chomiczewska, I. E., Medrzycka, K. & Karpenko, E., 2011. Biosurfactants - Biodegradability, Toxicity, Efficiency in comparison with Synthetic Surfactants.
- [74] Koch, A. K., Käppeli, O., Fiechter, A. & Reiser, J., 1991. Hydrocarbon Assimilation and Biosurfactant Production in *Pseudomonas aeruginosa* Mutants. *Journal of Bacteriology*, 173(13), pp. 4212-4219.
- [75] Kosaric, N., 2001. Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4), p. 295–304.
- [76] Kostka, J. E. y otros, 2011. Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), pp. 7962-7974 .
- [77] Kulka, R. G., 1956. Colorimetric Estimation of Ketopentoses and Ketohexoses. *Biochemical Journal*, 63(4), p. 542–548.
- [78] Lang, S. & Wullbrandt, D., 1999. Rhamnose lipids biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(1), pp. 22-32.
- [79] Leahy, J. G. & Colwell, R. R., 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*, 54(3), pp. 305-315.
- [80] Lebrón-Paler, A., 2008. Solution and Interfacial Characterization of Rhamnolipid Biosurfactant from *P.aeruginosa* ATCC 9027. *Tesis de Doctorado en Filosofía (PhD)*, University of Arizona, Arizona-USA.
- [81] Lebrón-Paler, A. y otros, 2006. Determination of the Acid Dissociation Constant of the Biosurfactant Monorhamnolipid in Aqueous Solution by Potentiometric and Spectroscopic Methods. *Analytical Chemistry*, Volumen 78, pp. 7649-7658.
- [82] Leitermann, F., Sylatk, C. & Hausmann, R., 2008. Fast quantitative determination of microbial rhamnolipids from cultivation broths by ATR-FTIR Spectroscopy. *Journal of Biological Engineering*, 2(13).
- [83] Lépine, F., Déziel, E., Milot, S. & Villemur, R., 2002. Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Journal of Mass Spectrometry*, Volumen 37, p. 41–46.
- [84] Lindahl, M., Faris, A., Wadström, T. & Hjertén, S., 1981. A new test based on 'Salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volumen 677, pp. 471-476.
- [85] Linhardt, R. J. y otros, 1989. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(3), p. 365–368.
- [86] Liu, T. y otros, 2011. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing bacterium from Daqing oil-contaminated sites. *African Journal of Microbiology Research*, 5(21), pp. 3509-3514.
- [87] Luo, Z. y otros, 2013. Optimizing rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 grown on waste frying oil using response surface method and batchfed fermentation. *Journal of Central South University*, Volumen 20, p. 1015–1021.
- [88] Maczek, J., Junne, S. & Götz, P., 2007. Examining biosurfactant producing bacteria—an example for an automated search for natural compounds. *Application Note CyBio AG*.
- [89] Maier, R. M. & Soberón-Chávez, G., 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(5), pp. 625-633 .
- [90] Makkar, R. S., Cameotra, S. S. & Banat, I. M., 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, 1(5).
- [91] Maqsood, M. I., Jamal, A. & Azeem, H. A., 2011. Effects of Iron Salts on Rhamnolipid Biosurfactant Production. *Biologia (Pakistan)*, 57(1&2), pp. 121-132.
- [92] Mata-Sandoval, J. C., Karns, J. & Torrents, A., 1999. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *Journal of Chromatography A*, Volumen 864, p. 211–220.

- [93] Medina-Moreno, S. A. y otros, 2011. Modeling rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* from immiscible carbon source in a batch system. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8(3), pp. 471-482.
- [94] Menezes Bento, F., de Oliveira Camargo, F. A., Okeke, B. C. & Frankenberger, W. T., 2005. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research*, Volumen 160, p. 249—255.
- [95] MINEM - Perú, 2010. *Mapa: Lotes con contratos para operaciones petroleras de exploración y explotación*. Lima: s.n.
- [96] Monsigny, M., Petit, C. & Roche, A. C., 1988. Colorimetric Determination of Neutral Sugars by a Resorcinol Sulfuric Acid Micromethod. *Analytical Biochemistry*, Volumen 175, pp. 525-530.
- [97] Monteiro, S. A. y otros, 2007. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. *Chemistry and Physics of Lipids*, Volumen 147, pp. 1-13.
- [98] Morici, L. A. y otros, 2007. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR Represses the Rhl Quorum-Sensing System in a Biofilm-Specific Manner. *Journal of Bacteriology*, 189(21), p. 7752–7764.
- [99] Morikawa, M., Hirata, Y. & Imanaka, T., 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volumen 1488, pp. 211-218.
- [100] Mulligan, C. N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), p. 183–98.
- [101] Mulligan, C. N., Cooper, D. G. & Neufeld, R. J., 1984. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *Journal of Fermentation Technology*, 62(4), pp. 311-314.
- [102] Mulligan, C. N. & Gibbs, B., 2004. Types, production and applications of biosurfactants. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, Volumen 70, pp. 31-55.
- [103] Mulligan, C. N. & Wang, S., 2006. Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam. *Engineering Geology*, Volumen 85, p. 75–81.
- [104] Mundo Azul, 2012. *Derrames de petróleo en el Perú*. [En línea] Available at: <http://peru.mundoazul.org/cero-contaminacion/petroleo-el-peligro-negro/accidentes-y-derrames-de-petroleo/derrames-de-petroleo-en-el-peru/> [Último acceso: Abril 2012].
- [105] Nguyen, T. T. & Sabatini, D. A., 2011. Characterization and Emulsification Properties of Rhamnolipid and Sophorolipid Biosurfactants and Their Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, Volumen 12, pp. 1232-1244.
- [106] Nielsen, T. H. y otros, 2002. Antibiotic and Biosurfactant Properties of Cyclic Lipopeptides Produced by Fluorescent *Pseudomonas* spp. from the Sugar Beet Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), p. 3416–3423.
- [107] Nie, M. y otros, 2010. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. *Biotechnology Advances*.
- [108] Ochsner, U. A., Hembach, T. & Fiechter, A., 1995b. Production of Rhamnolipid Biosurfactants. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, p. 53.
- [109] Ochsner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A. & Reiser, J., 1994. Isolation and Characterization of a Regulatory Gene Affecting Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 176(7), pp. 2044-2054.
- [110] Ochsner, U. A., Reiser, J., Fiechter, A. & Witholt, B., 1995a. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterogeneous host. *Applied and Environmental Microbiology*, Volumen 61, p. 3503–3506.
- [111] Olvera, C., Goldberg, J. B., Sánchez, R. & Soberón-Chávez, G., 1999. The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 179(1), pp. 85-90..

- [112] Onwosi, C. O. & Odibo, F. J. C., 2012. Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), pp. 937-942.
- [113] Onwosi, C. O. & Odibo, F. J. C., 2013. Use of response surface design in the optimization of starter cultures for enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas nitroreducens*. *African Journal of Biotechnology*, 12(19), pp. 2611-2617.
- [114] Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z. & Cameotra, S. S., 2011. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences*, Volumen 12, pp. 633-654.
- [115] Parra, J. L. y otros, 1989. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 66(1), pp. 141-145.
- [116] Pearson, J. P., Pesci, E. C. & Iglewski, B. H., 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology*, 179(18), pp. 5756-5767.
- [117] Peña, C., Castillo, T., Núñez, C. & Segura, D., 2011. Bioprocess Design: Fermentation Strategies for Improving the Production of Alginate and Poly- β -Hydroxyalkanoates (PHAs) by *Azotobacter vinelandii*. En: A. Carpi, ed. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications*. Rijeka-Croatia: InTech, pp. 217-242.
- [118] Pérez Silva, R. M., Ábalos Rodríguez, A., Gómez Montes de Oca, J. M. & Cantero Moreno, D., 2006. Biodegradation of Crude Oil by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 Strain. *Tecnología Química*, 26(1), pp. 70-77.
- [119] Perfumo, A., Banat, I. M., Canganella, F. & Marchant, R., 2006. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volumen 72, p. 132–138.
- [120] Pham, T. H., Webb, J. S. & Rehm, B. H. A., 2004. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology*, Volumen 150, pp. 3405-3413.
- [121] Pinzon, N. M., 2009. Rhamnolipid Biosurfactant Production from Glycerol: New Methods of Analysis and Improved Denitrifying Fermentation. *Tesis de Doctorado en Filosofía (PhD)*, University of Akron, Ohio-USA.
- [122] Pinzon, N. M. & Ju, L. K., 2009a. Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. *Biotechnology Letters*, Volumen 31, p. 1583–1588.
- [123] Pinzon, N. M. & Ju, L. K., 2009b. Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volumen 82, p. 975–981.
- [124] Plaza, G. A., Jangid, K., Lukasik, K. & Nalecz-Jawecki, G., 2008. Reduction of Petroleum Hydrocarbons and Toxicity in Refinery Wastewater by Bioremediation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Volumen 81, p. 329–333.
- [125] Plaza, G. A., Zjawiony, I. & Banat, I. M., 2006. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, Volumen 50, pp. 71-77.
- [126] Pons, A. y otros, 1981. A method for the simultaneous determination of total carbohydrate and glycerol in biological samples with the anthrone reagent. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Volumen 4, pp. 227-231.
- [127] Quénée, L., Lamotte, D. & Polack, B., 2005. Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques*, Volumen 38, pp. 63-67.
- [128] Rahim, R. y otros, 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, Volumen 40, p. 708–718.

- [129] Rahman, K. S. M. & Gakpe, E., 2008. Production, characterisation and applications of biosurfactants - Review. *Biotechnology*, 7(2), pp. 360-370.
- [130] Rahman, K. S. M. y otros, 2002. Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials. *Biotechnology Progress*, Volumen 18, pp. 1277-1281.
- [131] Rahman, P. K. S. M., Pasirayi, G., Auger, V. & Ali, Z., 2010. Production of rhamnolipid Biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 in a microfluidic bioreactor. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55(1), pp. 45-52.
- [132] Ramana, K. V. & Karanth, N. G., 1989. Factors Affecting Biosurfactant Production Using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under Submerged Conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Volumen 45, pp. 249-257.
- [133] Rasband, W., 2013. ImageJ 1.41o (<http://imagej.nih.gov/ij>). *National Institutes of Health, USA*.
- [134] Rashedi, H., Assadi, M. M., Bonakdarpour, B. & Jamshidi, E., 2005. Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2(1), pp. 59-62.
- [135] Rebello, S. y otros, 2013. Bioconversion of Sodium Dodecyl Sulphate to Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*: A Novel and Cost-Effective Production Strategy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volumen 169, p. 418–430.
- [136] Rehm, B. H. A., 2009a. *Alginates: Biology and Applications*. Londres-New York: Springer.
- [137] Rehm, B. H. A., 2009b. *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives*. Londres: Horizon Scientific Press.
- [138] Rehm, B. H. A., Mitsky, T. A. & Steinbüchel, A., 2001. Role of Fatty Acid De Novo Biosynthesis in Polyhydroxyalkanoic Acid (PHA) and Rhamnolipid Synthesis by *Pseudomonads*: Establishment of the Transacylase (PhaG)-Mediated Pathway for PHA Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), p. 3102–3109.
- [139] Rehm, B. H. A. & Steinbüchel, A., 1999. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volumen 25, p. 3–19.
- [140] Reiling, H. E. y otros, 1986. Pilot Plant Production of Rhamnolipid Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), pp. 985-989.
- [141] Rendell, N. B. y otros, 1990. Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volumen 1045, pp. 189-193.
- [142] Rikalovic, M. G., Gojgic-Cvijovic, G., Vrvic, M. M. & Karadzic, I., 2012. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77(1), p. 27–42.
- [143] Rooney, A. P., Price, N. P. J., Ray, K. J. & Kuo, T. M., 2009. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS Microbiology Letters*, Volumen 295, pp. 82-87.
- [144] Rosenberg, M., 1981. Bacterial Adherence to Polystyrene a Replica Method of Screening for Bacterial Hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(2), pp. 375-377.
- [145] Rosenberg, M., Gutnick, D. & Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons—a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, Volumen 1980, pp. 29-33.
- [146] Sabra, W., Zeng, A. & Deckwer, W., 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volumen 56, p. 315–325.
- [147] Sahoo, S., Datta, S. & Biswas, D., 2011. Optimization of Culture Conditions for Biosurfactant Production from *Pseudomonas aeruginosa* OCD1. *Journal of Advanced Scientific Research*, 2(3), pp. 32-36.
- [148] Salleh, S. M., Noh, N. A. M. & Yahya, A. R. M., 2011. Comparative study: Different recovery techniques of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* USMAR-2.

- International Conference on Biotechnology and Environment Management*, Volumen 18, pp. 132-135.
- [149] Santa Anna, L. y otros, 2001. Production of biosurfactant from a new and promising strain *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volumen 91, pp. 459-467.
 - [150] Santos, A. S. y otros, 2002. Evaluation of Different Carbon and Nitrogen Sources in Production of Rhamnolipids by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100(1-9), pp. 1025-1035.
 - [151] Sarachat, T., Pornsunthorntawe, O., Chavadej, S. & Rujiravanit, R., 2010. Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation. *Bioresource Technology*, Volumen 101, p. 324–330.
 - [152] Satpute, S. K. y otros, 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, pp. 1-18.
 - [153] Satpute, S. K., Bhawsar, B. D., Dhakephalkar, P. K. & Chopade, B. A., 2008. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian Journal of Marine Sciences*, 37(3), pp. 243-250.
 - [154] Sen, R., 2010. Biosurfactants. En: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Nueva York: Springer Science & Business Media, p. 359.
 - [155] Serrano Riaño, J. Y., 2010. Determination of cluster (phaC1, phaZ, phaC2, phaD, phaF, phaI) associated with the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase type II in a Colombian native strain. *Tesis de Maestría en Ciencias (Microbiología)*, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá-Colombia.
 - [156] Sha, R., Meng, Q. & Jiang, L., 2012. The addition of ethanol as defoamer in fermentation of rhamnolipids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Volumen 87, p. 368–373.
 - [157] Siegmund, I. & Wagner, F., 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*, 5(4), pp. 265-268.
 - [158] Singh, P., Sharma, S., Saini, H. & Chadha, B., 2009. Biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. and its role in aqueous phase partitioning and biodegradation of chlorpyrifos. *Letters in Applied Microbiology*, Volumen 49, p. 378–383.
 - [159] Singh, V., 2012. Biosurfactant – Isolation, Production, Purification & Significance. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2(2).
 - [160] Smania, A. M. y otros, 2004. Emergence of phenotypic variants upon mismatch repair disruption in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, Volumen 150, p. 1327–1338.
 - [161] Smyth, C. J. y otros, 1978. Differences in Hydrophobic Surface Characteristics of Porcine Enteropathogenic *Escherichia coli* With or Without K88 Antigen as Revealed by Hydrophobic Interaction Chromatography. *Infection and Immunity*, 22(2), pp. 462-472.
 - [162] Soberón-Chávez, G., 2010. *Biosurfactants: From Genes to Applications*. Londres/New York: Springer.
 - [163] Soberón-Chávez, G., Lépine, F. & Déziel, E., 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), pp. 718-725.
 - [164] Sylđat, C., Lang, S., Matulovic, U. & Wagner, F., 1985. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 40(1-2), pp. 61-67.
 - [165] Tadros, T. F., 2005. Adsorption of surfactants at the air/liquid and liquid/liquid interfaces. En: *Applied Surfactants: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley VCH, p. 81-82.
 - [166] Tahzibi, A., Kamal, F. & Assadi, M. M., 2004. Improved Production of Rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant. *Iranian Biomedical Journal*, 8(1), pp. 25-31.
 - [167] Tielen, P. y otros, 2010. Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, Volumen 156, p. 2239–2252.

- [168] Toribio, J., Escalante, A. E. & Soberón-Chávez, G., 2010. Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, Volumen 112, p. 1082–1087.
- [169] Turkovskaya, O., Dmitrieva, T. & Muratova, A., 2001. A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Journal of Applied Microbiology*, Volumen 37, pp. 71–75.
- [170] Urum, K., Pekdemir, T. & Gopur, M., 2003. Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions. *Process Safety and Environmental Protection*, 81(b3), pp. 203–209.
- [171] Uysal, A. & Türkman, A., 2005. Effect of biosurfactant on 2,4-dichlorophenol biodegradation in an activated sludge bioreactor. *Process Biochemistry*, Volumen 40, p. 2745–2749.
- [172] Van Delden, C., Pesci, E. C., Pearson, J. P. & Igleswski, B. H., 1998. Starvation Selection Restores Elastase and Rhamnolipid Production in a Quorum-Sensing Mutant *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Mutant. *Infection and Immunity*, 66(9), p. 4499–4502.
- [173] Van Der Vegt, W., Van Der Mei, H. C., Noordmans, J. & Busscher, H. J., 1991. Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volumen 35, pp. 766–770.
- [174] Van Dyke, M. I. y otros, 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(11), pp. 1071–1078.
- [175] Van Hamme, J. D., Singh, A. & P.Ward, O., 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), pp. 503–549..
- [176] Vaux, D. & Cottingham, M., 2001. *Method and apparatus for measuring surface configuration*. USA, Patente nº WO 2007/039729 A1.
- [177] Vinckx, T., Wei, Q., Matthijs, S. & Cornelis, P., 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* oxidative stress regulator OxyR influences production of pyocyanin and rhamnolipids: protective role of pyocyanin. *Microbiology*, Volumen 156, p. 678–686.
- [178] Volke-Sepúlveda, T. L. & Velasco-Trejo, J. A., 2003. *Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos intemperizados mediante composteo*. Mexico: CENICA.
- [179] Wadekar, S. D. y otros, 2012. Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42(3), pp. 249–266.
- [180] Walter, V., Sylatk, C. & Hausmann, R., 2010. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. En: R. Sen, ed. *Biosurfactants*. s.l.:Springer, pp. 1–13.
- [181] Wang, Q. y otros, 2007. Engineering Bacteria for Production of Rhamnolipid as an Agent for Enhanced Oil Recovery. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4), pp. 842–853.
- [182] Wargo, M. J. & Hogan, D. A., 2009. Identification of genes required for *Pseudomonas aeruginosa* carnitine catabolism. *Microbiology*, Volumen 155, p. 2411–2419.
- [183] Wei, Y. H., Chou, C. L. & Chang, J. S., 2005. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, Volumen 27, p. 146–154.
- [184] Wen, J., 2010. Investigation of the use of rhamnolipid biosurfactant from cadmium phytoextraction in soils. *Tesis de Doctorado en Filosofía (PhD)*, University of Adelaide, Adelaide-Australia.
- [185] Wild, M. y otros, 1997. Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. *FEMS Microbiology Letters*, Volumen 153, pp. 279–285.
- [186] Wilhelm, S. y otros, 2007. The Autotransporter Esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* Is Required for Rhamnolipid Production, Cell Motility, and Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, 189(18), pp. 6695–6703.

- [187] Willumsen, P. A. & Karlson, U., 1997. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, Volumen 7, pp. 415-423.
- [188] Witek-Krowiak, A. y otros, 2011. Ultrafiltrative separation of rhamnolipid from culture medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volumen 27, p. 1961–1964.
- [189] Wittgens, A. y otros, 2011. Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial Cell Factories* 2011, 10(80).
- [190] Wu, J. Y. y otros, 2008. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresource Technology*, Volumen 99, pp. 1157-1164.
- [191] Yateem, A., Balba, M., Al-Shayji, Y. & Al-Awadhi, N., 2002. Isolation and Characterization of Biosurfactant-Producing Bacteria from Oil-Contaminated Soil. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 11(1), pp. 41-55.
- [192] Youssef, N. H. y otros, 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, Volumen 56, pp. 339-347.
- [193] Yuste, L. y otros, 2000. Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS Microbiology Ecology*, Volumen 32, pp. 69-75.
- [194] Zhang, G. L., Wu, Y. T., Qian, X. P. & Meng, Q., 2005. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 6(8), pp. 725-730.
- [195] Zhang, X. S. y otros, 2012. Isolation and characterization of rhamnolipid producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from waste edible oils. *African Journal of Microbiology Research*, 6(7), pp. 1466-1471.
- [196] Zhang, Y. & Miller, R. M., 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10), p. 3276–3282.
- [197] Zhang, Y. & Miller, R. M., 1994. Effect of a *Pseudomonas* Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), pp. 2101-2106.
- [198] Zhang, Y. & Miller, R. M., 1995. Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n-Alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6), p. 2247–2251.
- [199] Zhu, Y. y otros, 2007. Reuse of waste frying oil for production of rhamnolipids using *Pseudomonas aeruginosa* zju.u1M. *Journal of Zhejiang University SCIENCE A*, 8(9), pp. 1514-1520.

X. ANEXOS

Tabla 12. Valores de significación de la prueba de Levene para igualdad de varianzas entre el área de los halos de los pocillos de 3.5 mm y 5.5 mm de diámetro con 10 µl de diferentes concentraciones de RL.

Halos	Concentración de RL (g/L)		
	100	50	25
H2	0.171	0.243	0.64
H3	0.812	0.056	-
H3.5	0.651	-	-
H4	0.954	0.132	0.368
H5	0.385	0.090	0.139

* Diferencias significativas ($\alpha=0.05$)

Tabla 13. Valores de significación de la prueba de Shapiro-Wilk para distribución normal del área de los halos de los pocillos de 3.5 mm y 5.5 mm de diámetro.

Concentración de RL (g/L)		Ø 5.5 mm					Ø 3.5 mm
		10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	10 µl
100	H2	0.588	0.710	0.531	0.233	0.596	0.522
	H3	1.000	0.795	0.211	0.342	0.349	0.177
	H3.5	0.928	0.227	0.703	0.604	0.502	0.574
	H4	0.962	0.218	0.862	0.451	0.440	0.271
	H5	0.245	0.137	0.690	0.992	0.727	0.741
50	H2	0.980	0.593	0.245	0.230	0.622	0.517
	H3	0.206	0.788	0.245	0.552	0.925	0.186
	H3.5	-	-	0.548	0.204	0.738	-
	H4	0.380	0.533	0.266	0.069	0.739	0.467
	H5	0.602	0.607	0.573	0.310	0.702	0.515
25	H2	0.964	0.407	0.736	0.756	0.659	0.812
	H3	-	0.955	-	-	-	-
	H4	0.676	0.384	0.157	0.585	0.514	0.407
	H5	0.194	0.372	0.537	0.156	0.272	0.702

Tabla 14. Valores de significación de la prueba de Levene para igualdad de varianzas entre el área de los halos de los inóculos con el mismo contenido de RL.

Inóculos		20 µl x 25 g/L vs. 10 µl x 50 g/L	10 µl x 100 g/L vs. 20 µl x 50 g/L	40 µl x 25 g/L vs. 20 µl x 50 g/L	40 µl x 25 g/L vs. 10 µl x 100 g/L	20 µl x 100 g/L vs. 40 µl x 50 g/L
		0.5	1	1	1	2
Contenido de RL (mg)						
Halo	H2	0.463	0.113	0.284	0.385	0.055
	H3	0.447	0.298	-	-	0.102
	H3.5	-	-	-	-	0.142
	H4	0.604	0.293	0.201	0.893	0.115
	H5	0.779	0.281	0.916	0.277	0.124

* Diferencias significativas ($\alpha=0.05$)

Tabla 15. Valores de significación de la prueba de Shapiro-Wilk para distribución normal del área de los halos a diferentes tiempos de incubación.

Concentración de RL (g/L)	Tiempos de incubación					
	24h	12h+R	24h+R	48h+R	72h+R	96h+R
200	0.875	0.468	0.855	0.253	0.678	0.473
100	0.741	0.130	0.180	0.477	0.441	0.123
50	0.805	0.508	0.747	0.843	0.420	0.284
25	0.603	0.238	0.377	0.461	0.373	0.620
12.5	0.973	0.582	0.683	1.000	0.543	0.443
6.25	0.747	0.743	0.510	0.981	0.493	0.608
3.125	0.951	0.273	0.478	0.339	1.000	0.864

+R: 24 horas de refrigeración (post-incubación a 4°C)

Tabla 16. Valores de significación de la prueba de Shapiro-Wilk para distribución normal del área de los halos en placas con diferente concentración de CTAB.

Concentración de RL (g/L)	Concentración de CTAB (g/L)			
	0.1	0.2	0.3	0.4
400	0.549	0.881	0.132	0.359
200	0.295	0.247	0.147	0.575
150	0.565	0.873	0.170	0.874
100	0.682	0.488	0.469	0.197
75	0.444	0.801	0.594	0.451
50	0.476	0.654	0.110	0.869
25	0.341	0.812	0.767	0.113
12.5	0.352	0.753	0.238	0.117
6.25	0.362	0.844	0.849	0.260
3.125	0.907	0.278	0.592	0.886

Tabla 17. Valores de significación de la prueba de Shapiro-Wilk para distribución normal del área de los halos de las cepas productoras de RL probadas en el agar CTAB/MB.

Cepa	Código de trabajo	sig.
ATCC 9027	9027	0.542
IIPKA4-1b	A2#	0.370
3BH10	B17	0.998
4B7(7)	C11	0.896
IB4	C9	0.654
T2X-2	D3	0.633
IIBT1-1	D3#	0.076
2K-6 [f]	N10f	0.977
2K-6 [i]	N10i	0.883
3BH-13	N18	0.879
4B7	N38	0.839
6K11	N42	0.400
PB25	PB25	0.786
IIIT1P2	R48*	0.515